UNTERSCHIEDLICHE EINFLÜSSE VON WACHSTUMSHORMON UND PROLAKTIN AUF DEN STOFFWECHSEL VON PROGESTERON IN PROSTATA UND VESIKULARDRÜSE UNREIFER RATTEN IN VIVO

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt von
CHRISTIAN BURGMANN
aus Bielefeld

Bonn 1976

UNTERSCHIEDLICHE EINFLÜSSE VON WACHSTUMSHORMON UND PROLAKTIN AUF DEN STOFFWECHSEL VON PROGESTERON IN PROSTATA UND VESIKULARDRÜSE UNREIFER RATTEN IN VIVO

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt von
CHRISTIAN BURGMANN
aus Bielefeld

Bonn 1976

Angefertigt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Bonn

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Karl-Oskar Mosebach

Korreferent: Prof. Dr.med. P. Brühl

Tag der mündlichen Prüfung: 28.4.1976

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der
Universität Bonn

Direktor: Prof. Dr. F. Zilliken

Druck: Richard Schwarzbold
Geltorfstraße 52
5305 Witterschlick b. Bonn

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Inhaltsübersicht

	Seite
I) Einführung	5
II) Theoretischer Teil	6
1) Wirkungen und Phänomenologie	6
a) Generelle Charakteristik der Biochemie von STH, Prolaktin, Testosteron und Progesteron im Säugetierorganismus	6
b) Wirkungen der peripheren Hormone Progesteron und Testosteron auf Prostata und Vesikulardrüse	1o
c) Wirkungen der hypothalamo-hypophysären Hormone auf Prostata und Vesikulardrüse	12
2) Schicksal des Progesterons im Säugetierorganismus unter dem Aspekt der Frage nach seiner Androgenität	14
a) Stoffwechselzusammenhang mit Testosteron	14
b) Begrenzte Spezifität der Rezeptoren	16
3) Frage nach der klinischen Relevanz, vergleichende Pathophysiologie	18
4) Theoretische Erörterung des Versuchsplanes	21
III) Experimenteller Teil	23
A) Methodik	23
1) Substanzen, Tiere, Vorbehandlung	23
2) Aufarbeitung der Organe	26
3) Extraktion der freien Metabolite	27
4) Chromatographische Trennungen	28
5) Radioaktivitätsmessungen	31
a) Bestimmung der Organ-Gesamtaktivitäten mit Hilfe der Flüssig-Szintillations-Spektrometrie	31
b) Bestimmung des Radioaktivitätsgehalts der Einzelmetabolite mit Hilfe der Radiopapierchromatographie oder der Flüssig-Szintillations-Spektrometrie	32
c) Identifizierung der Metabolite mit Hilfe der Rekristallisierung bis zur konstanten Spezifischen Aktivität	32
d) Identifizierung der Metabolite mit Hilfe der präparativen Radiogaschromatographie	35

Seite

B) Ergebnisse 37

1) Versuch A: Wirkungen von STH und Prolaktin auf die Aufnahme von radioaktiv markiertem Progesteron in Prostata und Vesikulardrüse 37

2) Versuche B bis D: Metabolitspektren von Progesteron 42

a) bei Orchidektomierten mit und ohne Progesteron-vorbehandlung (Versuche B und C) 42

b) bei Hypophysektomierten-Orchidektomierten mit und ohne Progesteron-, STH- und Prolaktin-Vorbehandlung (Versuch D) 46

C) Diskussion 53

1) Aufnahmestudie 53

a) Deutung der Unterschiede zwischen STH- und Prolaktinwirkung 53

b) Deutung der Unterschiede zwischen Prostata und Vesikulardrüse 54

2) Metabolitstudien 56

IV) Zusammenfassung 59

Literaturverzeichnis 62

Lebenslauf 67

I Einführung

Über die Frage, ob und unter welchen physiologischen, beziehungsweise pathophysiologischen Bedingungen die Hormone des hypothalamo-hypophysären Bereiches die Wirkungen der Androgene auf die akzessorischen Sexualorgane synergistisch oder auch antagonistisch beeinflussen, ist bisher wenig gearbeitet worden. Im Interesse einer äthiologischen Erforschung benigner und maligner Tumoren der Prostata ist es jedoch unbedingt erforderlich, einen umfassenden Überblick über alle Faktoren zu bekommen, die die Ansprechbarkeit der akzessorischen Sexualorgane, insbesondere die der Prostata bestimmen.

Seit LOSTROH (26) ist bekannt, daß Wachstumshormon (STH) die Aktionen des Testosterons bezüglich Gewicht und Nukleinsäurestoffwechsel der Prostata und Vesikulardrüse hypophysektomierter-orchidektomierter, juveniler Ratten steigert, ohne selbst wirksam zu sein. 1969 entdeckten v.BERSWORDT-WALLRABE und Mitarbeiter (21) darüberhinaus, daß Progesteron das Gewicht von Prostata, wesentlich geringfügiger von Vesikulardrüsen hypophysektomierter-orchidektomierter, juveniler Ratten wie ein Androgen steigert, und daß dieser Effekt durch Prolaktin verstärkt wird. In der Nachfolge sind nur wenige Arbeiten erschienen, die sich mit diesem Problem befassen. Keine der bisherigen Arbeiten hat Anhaltspunkte über den Mechanismus des synergistischen Zusammenspiels der erwähnten Hormone gebracht.

Die vorliegenden Untersuchungen sollten dazu dienen, solche Anhaltspunkte aufzufinden. Vor allem mußte geklärt werden, ob nach Applikation von Progesteron in Prostata und Vesikulardrüse nachweisbare Mengen eines Androgens oder wenigstens eines Vorgängers auftreten. Es waren also Metabolitstudien durchzuführen. Im positiven Falle wäre eine Vereinfachung der Problematik erreicht, da der erwähnte Synergismus dann lediglich das Zusammenspiel von Androgenen mit den beiden Hypophysenhormonen beträfe. Weiterhin erschien es sinnvoll, sich einer Grundfrage zu stellen, nämlich der, ob die beiden Hypophysenhormone die Aufnahme von Testosteron und Progesteron in

Prostata und Vesikulardrüse fördern. Eine solche Förderung hätte zwangsläufig eine erhöhte Wirkung zur Folge. Da in der vorliegenden Arbeit, wie oben ausgeführt, Progesteron im Mittelpunkt des Interesses stand, lag es nahe, auch diese Aufnahmestudien zunächst mit Progesteron durchzuführen.

II Theoretischer Teil

1) Wirkungen und Phänomenologie

a) Generelle Charakteristik der Biochemie von STH, Prolaktin, Testosteron und Progesteron im Säugetierorganismus

Die Hormone STH, Prolaktin, Testosteron und Progesteron seien anhand ihrer Hauptwirkungen im Gesamtorganismus kurz charakterisiert (1).

Das Wachstumshormon, ein Polypeptid (188 Aminosäuren) mit einem Molekulargewicht von 21500, das beim Menschen in einer Plasmakonzentration von o,1-o,6 µg/1oo ml vorkommt, wird in den eosinophilen α-Zellen des Hypophysenvorderlappens gebildet. Die adäquaten Reize für die Ausschüttung des übergeordneten releasing-factors aus dem Hypothalamus sind Hunger, Hypoglykämie, Stress und Schlaf. STH greift an den verschiedensten Stellen in den Stoffwechsel ein. Es wirkt grundsätzlich anabol. So wird die Eiweißsynthese gefördert, dadurch wird die Stickstoffbilanz positiv, gleichzeitig unterstützt durch die verminderte Reststickstoffausscheidung. Das Verhalten der Aminosäuren ist nicht einheitlich, entspricht aber im Wesentlichen dem erhöhten Bedarf für die Eiweißsynthese in der Zelle. Die Wirkung auf Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel kann nur unter gleichzeitiger Betrachtung der Insulinwirkungen beurteilt werden. STH allein steigert Lipolyse, freie Fettsäuren und Zucker im Blut (durch verminderten Eintritt der Glukose in die Zelle und Hemmung der Glykolyse), vermindert die Fettsynthese, kann also als diabetogen angesehen werden. Es kommt zum diabetes mellitus aber nur, wenn gleichzeitig kein Wachstum möglich ist (nach Abschluß der Wachstumsperiode), oder wenn Insulinmangel besteht und die Glukose nicht anders verwertet werden kann. Eine direkte Pankreasinselstimulation

durch STH konnte bisher nie sicher nachgewiesen werden, so daß die Insulinausschüttung nach STH-Gabe wohl indirekt über den erhöhten Blutzuckerspiegel zu erklären ist.

Den zahlreichen Stoffwechselwirkungen gegenüber tritt die namengebende Funktion des Wachstumshormons beinahe in den Hintergrund, zumal, wenn man bedenkt, daß die Wachstumsperiode nur ein knappes Drittel der Lebenszeit ausmacht, die STH-Sekretion jedoch während des gesamten Lebens nahezu konstant bleibt. Interessanterweise spielt auch hier Insulin eine Rolle: In seiner Abwesenheit kann STH seine Wachstumswirkung nicht entfalten!

Durch STH wird das enchondrale Knochenwachstum gefördert. Säulenknorpel und Knochenlamellen werden gebildet, anscheinend wird auch die Resorption von Kalzium aus dem Darm gefördert. Schilddrüsenhormon vermag die Wachstumswirkung des STH stark zu erhöhen, obwohl es allein kein Wachstum bewirkt.

Schließlich muß noch auf die Bedeutung des STH für die Mammogenese, die Laktogenese und die Galaktopoese hingewiesen werden, die zwar im Vergleich zu der stärkeren Wirkung des Prolaktins - oder prolaktinähnlicher Stoffe beispielsweise aus der Plazenta - gering ist, die jedoch, gerade weil die Existenz des Prolaktins beim Menschen immer noch nicht sicher bewiesen ist, nicht vernachlässigt werden darf.

Bevor ich auf das Prolaktin selbst zu sprechen komme, möchte ich die wichtigsten STH-induzierten Krankheiten erwähnen. Verminderte STH-Ausschüttung, am häufigsten verursacht durch Hypophysennekrosen, aber auch durch Tumoren, Zysten und Traumata, bewirkt beim Heranwachsenden den proportionierten Zwergwuchs, beim Erwachsenen bleibt sie meist ohne klinische Symptomatik, wird aber in letzter Zeit, wohl aufgrund der verfeinerten Diagnostik, häufiger gefunden. Erhöhte STH-Ausschüttung - häufigste Ursache ist hier das eosinophile Adenom der Hypophyse - führt je nach Zustand der Epiphysenfugen zum Riesenwuchs oder zur Akromegalie.

Das Prolaktin, früher luteotropes oder luteo-mammotropes Hormon genannt, ist ebenfalls ein Polypeptid mit einem Molekular-

gewicht von 24000 (beim Schaf). Angaben über menschliches Prolaktin liegen nur sehr vereinzelt vor, da eine Trennung vom STH nach chemischen und immunologischen Kriterien Schwierigkeiten bereitet. Seine Existenz auch beim Menschen muß jedoch gefordert werden, wenn man die eindrucksvollen Befunde von RIMOIN (1968) und PEAKE (1969) interpretieren möchte. RIMOIN fand bei Fällen von Zwergwuchs mit isoliertem STH-Mangel normalen Laktations- und Schwangerschaftsverlauf, PEAKE beschrieb einen menschlichen Hypophysentumor mit LTH-, nicht aber STH-Aktivität. Prolaktin wird wahrscheinlich in den azidophilen Zellen der Adenohypophyse gebildet. Ebenso wie das STH unterliegt es einem Reglermechanismus durch den Hypothalamus, der seinerseits durch periphere Hormone wie Östrogene, Thyroxin, Progesteron, Testosteron und Cortisol beeinflußt wird.

Hauptwirkung des Prolaktins ist die Stimulierung der Brustdrüse der Säugetiere (s.o.). Eine Anregung der corpora lutea ist von der Ratte bekannt. Die Wirkung auf den Kropf der Taube wird für quantitative Untersuchungen ausgenutzt. In einer neueren Arbeit mit schwangeren Ratten fanden YANG und Mitarbeiter (1973) bei kombinierter Gabe von ICSH und Prolaktin eine schwangerschaftserhaltende Wirkung, während Prolaktin allein nicht, ICSH erst bei sehr hoher, sicher unphysiologischer Dosierung dazu in der Lage war (2).

Wegen der komplizierten Verhältnisse bezüglich der Unterscheidbarkeit von STH und Prolaktin möchte ich hier noch ein weiteres, sogenanntes prolaktinähnliches Hormon erwähnen, das in der Plazenta gebildet wird, ein Molekulargewicht von etwa 38000 hat und sich ebenfalls chemisch und immunologisch kaum vom STH trennen läßt, das HPL, Human Placental Lactogen. Seine biologischen Eigenschaften scheinen denen des Prolaktins voll zu entsprechen.

Das Testosteron, ein Steroidhormon mit 19 Kohlenstoffatomen, wird in den LEYDIGschen Zwischenzellen des Hodens, in kleinen Mengen auch in der Nebennierenrinde und im Ovar gebildet. Die Plasmakonzentration unterscheidet sich zwischen Mann und Frau

um etwa eine Zehnerpotenz: o,7 µg/1oo ml beim Mann, o,o5 µg/1oo ml bei der Frau. Seine Hauptwirkung ist die Herausdifferenzierung der Merkmale des männlichen Geschlechts. Das betrifft nicht nur das Genitale selbst, sondern auch die akzessorischen Sexualorgane, den Larynx (Mutation der Stimme), die Muskulatur, das Wachstum allgemein, die Skelettreifung und die Psyche. Unter den Stoffwechselwirkungen ist vor allem die proteinanabole Wirkung zu erwähnen, aber auch die Steigerung der Zellatmung und die Erhöhung der Lipoproteine im Blut, die für die Atheromatose der Arterien als mitverantwortlich gelten. In Prostata und Vesikulardrüse wird die Produktion von Fruktose, Zitrat und saurer Phosphatase angeregt. Entsprechend diesen zahlreichen und zum Teil sehr allgemeinen Wirkungen des Testosterons im Gesamtorganismus gibt es eine Vielzahl von klinischen Störungen, die mit dem Testosteron zusammenhängen. Ihre Darstellung würde hier zu weit führen. Erwähnt sei lediglich der primäre und sekundäre (hypophysäre) Hypogonadismus, sowie die Bedeutung des Testosterons für die Therapie des Mammakarzinoms.

Progesteron, ein Sexualsteroidhormon mit 21 Kohlenstoffatomen, wird hauptsächlich in den Ovarien gebildet. Die Plasmakonzentration unterliegt erheblichen Schwankungen (3 Zehnerpotenzen), von o,o3 µg/1oo ml in der Menopause über ca 2 µg/1oo ml in der zweiten Zyklushälfte bis zu 2o µg/1oo ml gegen Ende der Schwangerschaft.

Progesteron bewirkt im normalen Zyklus der Frau die sekretorische Umwandlung des Endometriums und bereitet so die Nidation vor. Die folgenden Wirkungen - Viskositätserhöhung des Zervixschleims, Hemmung der Ovulation, Ruhigstellung des Uterus, Verminderung der Empfindlichkeit des Ovars gegenüber Gonadotropinen - lassen sich als schwangerschaftserhaltend zusammenfassen. Außerdem fördert Progesteron die Entwicklung der Alveoli in der Milchdrüse. Die Wirkung auf den Stoffwechsel läßt sich als leicht katabol bezeichnen, indem Progesteron die Aktivität der ATPase erhöht und so biologisch nutzbare Energie freisetzt.

b) Wirkungen der peripheren Hormone Progesteron und Testosteron auf Prostata und Vesikulardrüse

Über die Einflüsse des Testosterons auf die Prostata, die Vesikulardrüsen und andere akzessorische Sexualorgane gibt es inzwischen eine kaum noch überschaubare Literatur. Zusammenfassende Darstellungen hierüber finden sich im Buch "Fermente, Hormone, Vitamine" von AMMON und DIRSCHERL (3), in "The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract" von MANN (4) und im "Textbook of Pharmakology" von GOODMAN und GILMAN (5).

Im Rahmen dieser Arbeit sind die Einflüsse auf den Nukleinsäure- und Eiweißstoffwechsel von besonderer Bedeutung. Die Förderung der Eiweißsynthese durch Testosteron ist letztlich der entscheidende Grund für die Stimulierung des Gewichts der akzessorischen Sexualorgane. An dieser Stelle verdient KOCHAKIAN (6) erwähnt zu werden, der diesen Einfluß von Testosteron auf die Eiweißsynthese in Prostata und Vesikulardrüse als erster entdeckt und bearbeitet hat. KOCHAKIAN verdanken wir auch eine Reihe vorzüglicher Arbeiten über den Einfluß von Testosteron auf den Nukleinsäurestoffwechsel in der Prostata und Vesikulardrüse der Ratte, sowie der Mäuseniere (7). Einen Überblick über alle wesentlichen Arbeiten bis zum Jahre 1965 gibt KOCHAKIAN in seinem Buch "Mechanisms of Hormone Action" (8). Bei in-vivo-Versuchen kann man bereits 15 min nach einmaliger Applikation von Testosteron einen Einfluß auf den Einbau von radioaktivem Phosphat in die RNA der Prostata erwachsener, kastrierter Ratten beobachten (9). Es ist inzwischen sehr wahrscheinlich geworden, daß Steroidhormone bereits während der ersten Minuten nach Applikation am genetischen Apparat der Kerne in den Zielorganen zu wirken beginnen. Es gibt Anhaltspunkte dafür, daß die Theorie von TATA (1o,11) über Key-Intermediary-Proteins (KIP) zutrifft, nach der zunächst und sehr schnell nach Applikation Schlüsselproteine in geringer Zahl synthetisiert werden, die in kaskadenartiger Folge die Synthese weiterer Proteine auslösen. Selbstverständlich muß es entsprechend eine Schlüssel-RNA (spezielle m-RNA) geben, die für die Synthese von KIP zuständig ist.

Wie bei Östrogenen wurde auch für Androgene (12,13,14) gefunden, daß sie nach Applikation zu einer beschleunigten Synthese von m-RNA, r-RNA und Polyribosomen führen. Gleichzeitig wird die RNA-Polymerase-Aktivität, die RNA-Synthesefähigkeit des Chromatins, die Aufnahme von radioaktiv markierten Vorstufen in die Kern-RNA, die Ausschleusung von RNA aus dem Kern ins Zytoplasma und auch die Synthesefähigkeit des Chromatins bei Verwendung fremder RNA-Polymerase gesteigert.

Eine wichtige Rolle bei der Hormonwirkung spielt die heterogene Fraktion der sauren Nicht-Histon-Proteine. Sie heben die hier nicht näher beschriebene hemmende Wirkung der Histon-Fraktion auf die RNA-Synthese auf. Sie bestimmen, welcher Anteil der DNA für die RNA-Synthese zur Verfügung steht, und sie regeln die Genaktivierung dadurch, daß sie bestimmte Genorte vor der Blockade durch Histone schützen. Es ist von höchstem Interesse, daß Steroidhormone die Synthese solcher Nicht-Histon-Proteine im Zellkern fördern (15). Die Freigabe der Gene wird auch dadurch gefördert, daß die Steroide die hemmenden Histone acetylieren und phosphorylieren. Insbesondere acetylierte Histone hemmen wesentlich schwächer als nicht-acetylierte Histone (16). Anscheinend gehören Phosphorylierungen und Acetylierungen der Histon- und Nicht-Histon-Proteine zu den frühesten Effekten von Steroidhormonen in den Erfolgszellen.

Im eigenen Arbeitskreis interessieren in diesem Zusammenhang vor allem unterschiedliche Einflüsse von Testosteron auf den Nukleinsäure- und Proteinstoffwechsel in Prostata und Vesikulardrüse. So wurde beobachtet, daß 2oo µg Testosteronpropionat nach einmaliger Gabe in 4o Tage alten Ratten nach 2o h den Einbau von Uridin in die RNA der Prostata um 1oo%, den in die RNA der Vesikulardrüse um 25o% steigern (17, DAHNKE, SCHEUER, MOSEBACH). Nach fünftägiger Vorbehandlung mit täglichen Dosen von 2oo µg Testosteronpropionat ist in beiden Organen kein Einfluß auf den Uridineinbau mehr festzustellen. Dennoch steigert Testosteronpropionat nicht nur nach 2ostündiger, sondern auch nach 5-tägiger Vorbehandlung den Einbau von radioaktiv markierten

Aminosäuren in die Proteine. Wiederum ist der Effekt bei der Vesikulardrüse wesentlich stärker als bei der Prostata. Auf Phänomene, bei denen umgekehrt die Wirkungen an der Prostata ausgeprägter als an der Vesikulardrüse sind, wird in späteren Abschnitten eingegangen.

Auch Progesteron fördert das Wachstum der Prostata in juvenilen Ratten, jedoch nur in Gegenwart intakter Hypophysen (18,19). Merkwürdigerweise - das sei im Rahmen dieser Arbeit wiederum besonders herausgestellt - spricht demgegenüber die Vesikulardrüse nur sehr schwach auf eine 6tägige Behandlung mit 1-4 mg Progesteron pro Tag an. Das Alter der Tiere bei diesen Untersuchungen wurde nicht angegeben, das Gewicht der Tiere betrug 33-38 g. Nach eigenen Erfahrungen sind derartige Tiere ca 3o Tage alt.

c) Wirkungen der hypothalamo-hypophysären Hormone auf Prostata und Vesikulardrüse

In diesem Abschnitt soll lediglich auf die Einflüsse der beiden Hormone STH und Prolaktin eingegangen werden.

Es gibt eine Reihe von Veröffentlichungen, in welchen synergistische Wirkungen von Prolaktin und Androgenen auf die Prostata beschrieben werden (2o,21,22). Hierbei wird auch auf eine mögliche Bedeutung für die Entstehung von Prostataadenomen eingegangen. Die Frage einer Rückkopplung zwischen Prostata und Hypophyse ist noch umstritten (23,24,25). Grundlegend bezüglich des Testosterons ist die Arbeit von LOSTROH (26) aus dem Jahre 1962, in der gezeigt wird, daß nicht nur Prolaktin, sondern auch STH den Einfluß des Testosterons auf das Gewicht, den Protein- und RNA-Gehalt der Prostata hypophys-orchidektomierter (HEOREr) Ratten steigert, ohne allein wirksam zu sein. Es ist übrigens von großem Interesse, daß es sich hierbei offensichtlich um ein allgemeines Prinzip der Ansprechbarkeit androgener Erfolgsorgane handelt. So konnten vor wenigen Jahren ELBING und Mitarbeiter (27) zeigen, daß die Talgdrüsen HEOREr Ratten kaum Talg produzieren, und daß weder Testosteron noch die beiden Hypophysenhormone STH und Prolaktin allein in der Lage sind, die Talgproduktion zu stimulieren. Die Wirkung des Testosterons

setzt erst dann wieder ein, wenn gleichzeitig STH oder Prolaktin appliziert wird.

Auch die androgenen Wirkungen des Progesterons auf die Prostata juveniler, HEOREr Ratten werden durch Gaben von Prolaktin auffallend verstärkt, wie aus der schon zitierten Arbeit von v. BERSWORDT-WALLRABE und Mitarbeitern (21) hervorgeht. Wiederum wird betont, daß dies für die Vesikulardrüse nicht gelte. Außerdem wird nocheinmal herausgestellt, daß die Wirkung des Progesterons allein vernachlässigt werden kann.

Im eigenen Arbeitskreis wurde das Problem eines unterschiedlichen, synergistischen Zusammenwirkens von Prolaktin und Progesteron bei Prostata und Vesikulardrüse juveniler, HEOREr Ratten erneut in Angriff genommen. Hierbei wurden nicht nur Einflüsse auf das Gewicht, sondern auch solche auf den DNA- und RNA-Stoffwechsel berücksichtigt. Es war deutlich geworden, daß Androgene in den akzessorischen Sexualorganen die DNA- und RNA-Konzentrationen sowie den RNA/DNA-Quotienten in charakteristischer Weise verändern (28,29,3o). Es lag daher nahe zu prüfen, ob sich die Wirkungen des Progesterons auch bezüglich des Nukleinsäurestoffwechsels als androgene Wirkungen erweisen. Dies wäre selbstverständlich lediglich eine notwendige, aber nicht bereits hinreichende Voraussetzung, von androgenen Wirkungen des Progesterons sprechen zu dürfen. In der Tat zeigte sich, daß Applikation von Progesteron in HEORE Ratten zu Änderungen der DNA- und RNA-Konzentrationen führt wie Testosteron, und daß STH, wesentlich schwächer Prolaktin, ohne eigene Wirkung diese Einflüsse des Progesterons synergistisch verstärken (31). Wiederum lösten Progesteron bzw. die Kombination STH (Prolaktin)/Progesteron auf die Prostata einen wesentlich stärkeren Effekt aus als auf die Vesikulardrüse. Allerdings muß hierbei erwähnt werden, daß auch die Folgen der Hypophys-orchidektomie bei der Prostata wesentlich ausgeprägter waren als bei der Vesikulardrüse. Es war also gar nicht zu erwarten, daß Progesteron bzw. die erwähnte kombinierte Gabe auf die Vesikulardrüse gleichstark einwirkte wie auf die Prostata. Immerhin ist auch bereits dieses

geringe Reagieren der juvenilen Vesikulardrüse auf Entzug der gonadalen und hypophysären Hormone verglichen mit dem Reagieren der Prostata von höchstem Interesse. Zum Unterschied von den Versuchen von v.BERSWORDT-WALLRABE et al. muß außerdem herausgestellt werden, daß sich bei unseren Versuchen Progesteron allein auch bei diesen jungen HEOREn Tieren als wirksames Androgen erwies, nicht nur bezüglich des Gewichts, sondern auch bezüglich des Nukleinsäurespiegels.

Im Zusammenhang mit dieser Arbeit muß noch auf folgende Tatsache hingewiesen werden: Sowohl bei den früheren Versuchen über ein synergistisches Zusammenwirken von hypophysären Hormonen und Progesteron auf den Nukleinsäurestoffwechsel in akzessorischen Sexualorganen, als auch bei der vorliegenden Arbeit über entsprechende synergistische Effekte bezüglich der Progesteronaufnahme und der Progesteronmetabolisierung wurde zunächst ein Prolaktin-Präparat der Schering-AG eingesetzt, das, wie eigene Analysen zeigten, stark mit STH verunreinigt war. Bei den hier aufgeführten Ergebnissen handelt es sich mit einer Ausnahme (Einfluß von STH und Prolaktin auf die Aufnahme von ^{3}H-Progesteron in Vesikulardrüse und Prostata) um gemeinsame Einflüsse von STH und Prolaktin auf die erwähnten Parameter.

2) Schicksal des Progesterons im Säugetierorganismus unter dem Aspekt der Frage nach seiner Androgenität

a) Stoffwechselzusammenhang mit Testosteron

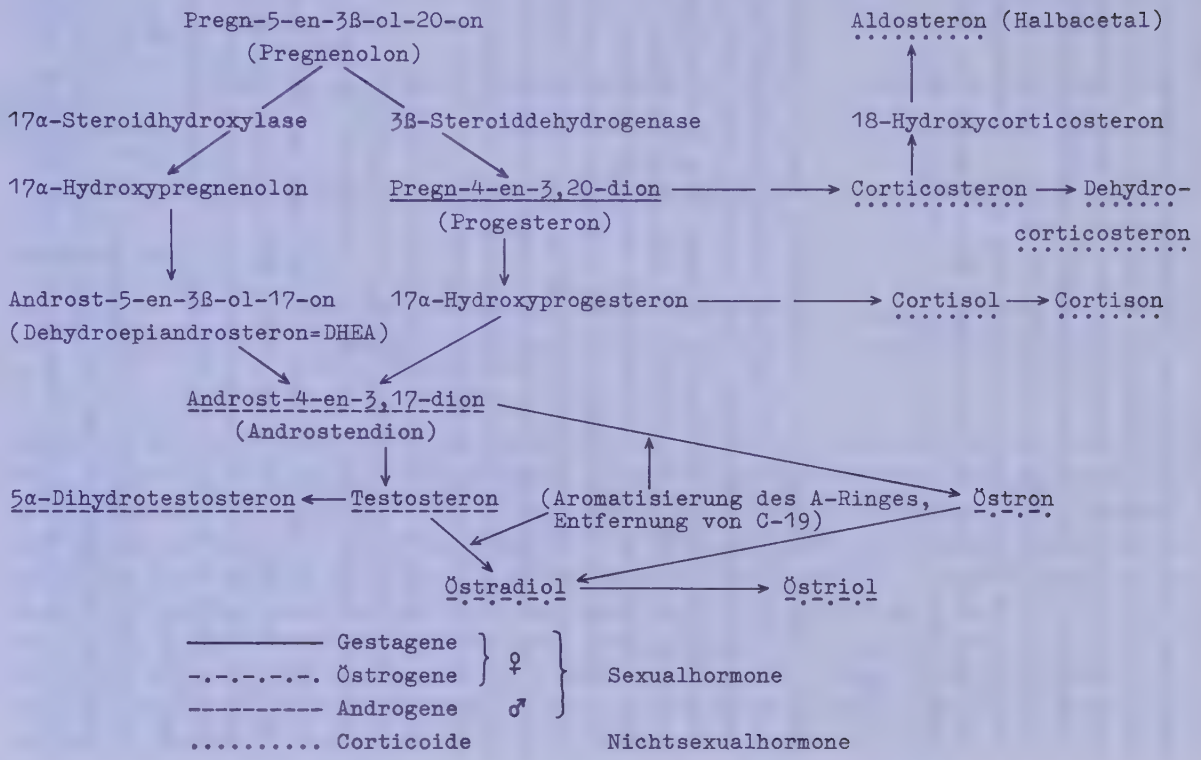
Die Biosynthese sämtlicher Steroidhormone geht von der aktiven Essigsäure aus und verläuft über Squalen und Cholesterin zum Pregnelolon (P^{5}-3ß-ol-2o-on).

Abb.1 Seite 15

Von hier gibt es zwei Wege zum Androstendion, von dem sich die Androgene und Östrogene ableiten. Die Corticoide entstehen auf dem Weg über Progesteron.

Zur Frage nach einer Erklärung der obengenannten androgenen

Abb. 1: Biosynthese der Steroidhormone vom Pregnenolon aus



Eigenschaften des Progesterons ist also zunächst einmal festzustellen, daß Testosteron aus Progesteron entstehen kann, und daß vielleicht nicht Progesteron selbst androgen wirkt, sondern eben sein "Metabolit" Testosteron. Die Fähigkeit des Hodens, Progesteron in Testosteron umzuwandeln, scheint bereits in der Fetalperiode vorhanden zu sein (32,33) und unterliegt nach der Geburt einem biphasischen Kurvenverlauf (34). Nach YAMADA und MATSUMOTO (35) gibt es noch weitere Verbindungen, die vom Progesteron über seine Metabolite zu den Androgenen führen:

Abb.2 Seite 17

Danach erfolgt zunächst die 5α-Reduktion, dann die Hydrierung an C-3, erst jetzt die 17α-Hydroxylierung und zuletzt die oxidative Seitenkettenabspaltung. Ein weiterer, wenn auch in geringerem Maße beschrittener Weg verläuft über 5α-Dihydroprogesteron, 5α-P-17α-ol-3,2o-dion und Androstandion direkt zum 5α-Dihydrotestosteron, dem stärksten endogenen Androgen.

Die Umwandlung des Progesterons in Androgene ist allerdings keineswegs der Hauptmetabolisierungsweg. Die weitaus größte Menge des Progesterons wird als Pregnandiol-Glukuronid über die Niere ausgeschieden. Die Hauptmetabolite des Progesterons sind (nach Häufigkeit geordnet) folgende (34,36,37,38):

5α-P-3,2o-dion, P^4-2oα-ol-3-on, P^4-17α-ol-3,2o-dion, 5α-P-3α(ß)-ol-2o-on, 5α-P-3α,2oα-diol, Pregnantriole, Spuren P^4-16α-ol-3,2o-dion, P^4-7α-ol-3,2o-dion, P^4-6ß-ol-3,2o-dion

Außerdem geben einige Autoren (37,38) einen weiteren Metaboliten an, der sich in allen Chromatographiesystemen unpolarer verhält als 5α-Dihydroprogesteron! Möglicherweise handelt es sich hierbei um ein C-19-Steroid mit Δ^{16}-Doppelbindung, etwa 5α-A^{16}-3-on.

b) Begrenzte Spezifität der Rezeptoren

Außer der Möglichkeit, daß die androgenen Wirkungen des Progesterons durch partielle Umwandlung dieses Steroids in Andro-

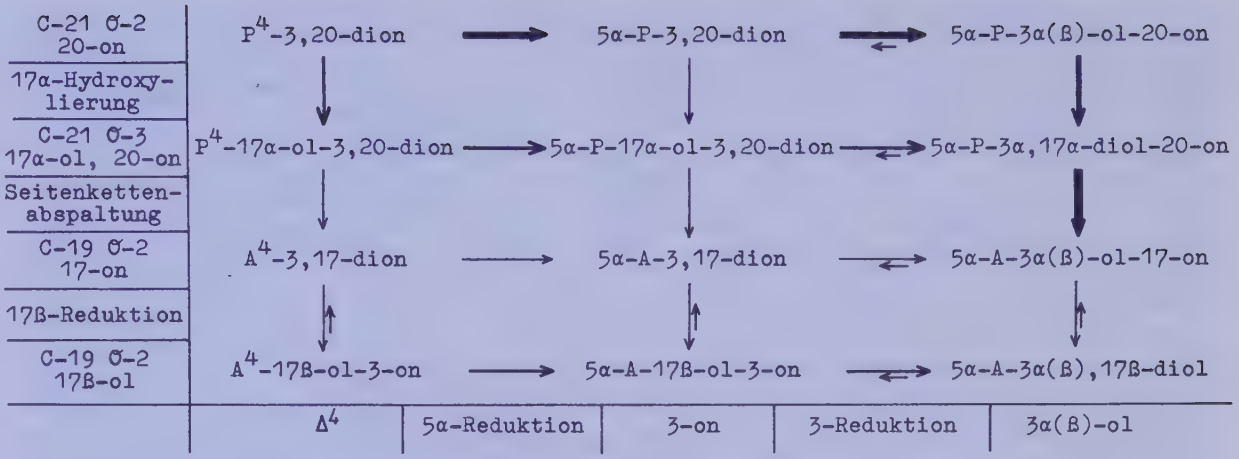


Abb. 2: Stoffwechselwege vom Progesteron zu 5α-reduzierten C-19-Steroiden im Hoden 33 Tage alter Ratten in vitro. Entnommen aus M. YAMADA (1974): "Pathway from Progesterone to 5α-Reduced C-19-Steroids Not Involving Androstenedione and Testosterone in Immature Rat Testes in vitro". - Dicke und lange Pfeile bedeuten häufig beobachtete Reaktionen, dünne und kurze Pfeile bedeuten selten beobachtete Reaktionen. Die Art der Reaktion ist jeweils links bzw. unten angegeben. Gemeinsame Charakteristika von unter- oder nebeneinanderstehenden Substanzen stehen unter oder neben der zugehörigen Spalte.
Beispiel: C-21 Ø-3 17α-ol, 20-on = Alle Substanzen dieser Spalte haben 21 Kohlenstoffatome, 3 Sauerstoffatome, eine Hydroxy-Gruppe in α-Stellung an C-Atom 17 und eine Oxo-Gruppe an C-Atom 20 im Molekül.

gene - sei es irgendwo im Körper, oder in den akzessorischen Sexualorganen selbst - zustande kommt, muß noch eine völlig andere Deutung in Betracht gezogen werden. Es existiert nunmehr eine kaum noch zu überschauende Literatur über die Bedeutung von Proteorezeptoren für die Wirkung von Steroidhormonen, insbesondere Sexualsteroiden (Sammelliteratur bei BEAULIEU -39- und JENSEN -4o-). Hierbei hat sich herausgestellt, daß die Spezifität dieser Rezeptoren keineswegs so ausgeprägt ist, wie man dies ursprünglich annahm. Im eigenen Arbeitskreis konnten wir zeigen, daß beispielsweise die Rezeptoren in den Kernen der Rattenprostata mit vergleichsweise hoher Affinität außer 5α-Dihydrotestosteron, dem eigentlichen Androgen, auch Progesteron zu binden vermögen. Da zur Zeit noch keineswegs klar ist, ob am genetischen Apparat im Kern die Steroide selbst, oder die durch die Steroide an den Wirkort gelangten Rezeptoren, oder der gesamte Komplex, oder völlig neu entstandene Komplexe höherer Ordnung (Chromatin) angreifen, muß durchaus mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß auch unverändertes Progesteron androgen wirksam werden kann. Das würde vor allen Dingen für den Fall gelten, daß es auf den Kernrezeptor ankommt.

3) Frage nach der klinischen Relevanz, vergleichende Pathophysiologie

Über die Entstehung der sogenannten Prostatahypertrophie ("Adenom oder Hyperplasie der akzessorischen, submukösen, suburethralen Drüsen der hinteren Harnröhre bei gleichzeitiger Atrophie der Prostata", 41), und damit indirekt auch des Prostatakrebses (42), sind seit dem vergangenen Jahrhundert die verschiedensten Theorien entstanden. Während sich die Theorien von CIECHANOVSKY (Entzündungstheorie, 1896), LAUNOIS (1885) und GUYON (1893, Arteriosklerotische Entstehungstheorie), VIRCHOW und BILLROTH et al. (Neubildungstheorie, 1875), WHITE (1896) und McEWAN (1897, endokrine Hodenunterfunktion) und LAQUEUR et al. (östrogene Entstehungstheorie in Analogie zum Uterusmyom und dem Fibroadenom der Mamma) isoliert mit der Prostata befassen, enthält die Theorie von CHWALLA (1948/49) erstmals einen

Ansatz zur Klärung der Tatsache, daß die Veränderungen an der Prostata seit Jahrhunderten als weitverbreitet bekannt und beschrieben sind, dagegen Ähnliches bei der entwicklungsgeschichtlich, histologisch und funktionell verwandten Vesikulardrüse praktisch nicht vorkommt. Bevor ich auf dieses Phänomen näher eingehe, sei noch eine weitere innersekretorische Entstehungstheorie erwähnt, die eine Überproduktion von Hypophysenvorderlappenhormonen annimmt (42).

Verläßliche Zahlen über die Häufigkeit der sogenannten Prostatahypertrophie zu bekommen ist schwierig, da weder die Angaben des Pathologen, noch die des Urologen für die Gesamtbevölkerung repräsentativ sind. Zusätzlich ist die Altersverteilung zu beachten. Die Prozentzahlen schwanken zwischen 4o und 9o% bei den über 5ojährigen (43). Ein Übergang der Prostatahypertrophie in ein Prostatakarzinom findet sich - je nach Untersucher - in 1o bis 3o% der Prostatiker (41), die Gesamthäufigkeit des Prostatakrebses beträgt 3o% bei den über 5ojährigen (43). Gutartige Tumoren sowie andere bösartige Geschwulste (Sarkome) sind selten (41). Nebenbei sei bemerkt, daß die Prostatahypertrophie in Japan und China zu den Seltenheiten gehört, und daß sie in Indien früher auftritt als bei uns, weshalb man angesichts der dort ebenfalls frühzeitigen Geschlechtsreife (und der geringen Lebenserwartung) einen ursächlichen Zusammenhang zwischen der Reifung der Prostata und ihrer Erkrankung diskutiert (41).

Ganz anders die Verhältnisse bei der Vesikulardrüse. Eine der Prostatahypertrophie entsprechende Erkrankung ist nicht bekannt; in der Weltliteratur sind eine handvoll Myome, ein Fibroadenom und ein Zystadenom, an bösartigen Tumoren ein Sarkom und ein knappes Dutzend Karzinome beschrieben (43).

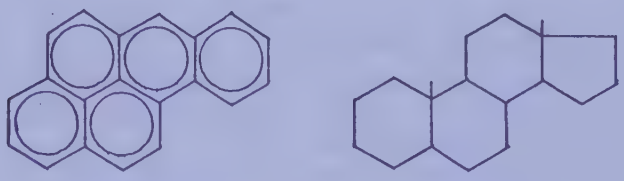
Die oben zitierte Theorie von CHWALLA versucht diesen entscheidenden Unterschied zu erklären, indem sie die im Harn ausgeschiedenen Androgene für die Veränderungen der Prostata verantwortlich macht. Sie sollen durch Diffusion direkt auf die paraurethralen Drüsen einwirken und können natürlich auf diesem Wege die Vesikulardrüse nicht erreichen. Der Nachweis von 17-Oxosteroiden im Prostataadenom stützt diese Theorie, zumal im

Fibroadenom der Mamma Östrogene gefunden wurden (42). CHWALLA führt darüberhinaus folgende Beobachtungen und konstitutionellen Faktoren bei Prostatikern an:

häufig:	Arteriosklerose Neu- und Fehlbildungen Gallensteinleiden (n.b.: Steroidgerüst der Gallensäuren!) Lungenemphysem Herzhypertrophie arterielle Hypertonie starke Körperbehaarung, männliche Schambehaarung
selten:	Tuberkulose und andere Infektionskrankheiten atrophische oder unterentwickelte Nebennierenrinden und Hypophysenvorderlappen

Er versucht, alle diese Symptome mit der - gleichfalls von ihm beobachteten - kräftigen Hormonproduktion (Gonaden, Nebennierenrinde, Hypophysenvorderlappen) der Prostatiker zu erklären.

Die Autoren SZENDRÖI und BALOGH (44), die sich in neuerer Zeit mit der Entstehung des Prostatakrebses befaßt haben, bezweifeln eine direkte androgene Entstehung. Sie führen einerseits die allgemeine Beobachtung an, daß Hypophysektomie eine Entwicklungshemmung von Geschwulsten bewirkt (45) und weisen andererseits auf die auffällige strukturelle Verwandtschaft zwischen dem bekanntermaßen kanzerogenen Stoff 3,4-Benzypren und Steroiden hin (46).



3,4-Benzpyren Androstan

Abb. 3: Strukturelle Ähnlichkeit von 3,4-Benzpyren und dem Steroidgrundgerüst (hier Androstan)

Während man bei anderen Erkrankungen über zufällige Therapieerfolge mit bestimmten Substanzen manches Mal in der Pathogenese einen Schritt weiter gekommen ist, sind die Befunde auf dem Gebiet der Prostatahypertrophie und des Prostatakrebses so vielfältig, daß man eher von einer Verwirrung sprechen muß. Man hat sowohl mit Androgenen (bei der Hypertrophie) als auch mit Antiandrogenen (Cyproteron und Cyproteronacetat), Östrogenen, Gestagenen und Kortikoiden beim Prostatakrebs Behandlungserfolge erzielen können. Auch Hormonentzug (Orchidektomie, Hypophysektomie, Adrenalektomie) kann wirksam sein (47). Die Ursachen hierfür oder gar der Wirkungsmechanismus blieben weiter im Dunkeln.

4) Theoretische Erörterung des Versuchsplanes

Die Vorüberlegungen über den genauen Ablauf eines Versuchs oder einer Versuchsreihe sind meist außerordentlich vielfältig und in ihrer Gesamtheit schwer wiederzugeben. Ich beschränke mich daher hier auf die wichtigsten Punkte zur Charakterisierung der Versuche.

Zwei Versuchstypen sind grundsätzlich zu unterscheiden: Die Versuche B bis D sind Metabolitstudien, die dazu dienten, Unterschiede zwischen Prostata und Vesikulardrüse in ihrem Metabolisierungsvermögen für Progesteron unter dem Einfluß von STH und Prolaktin allein - oder in Kombination mit Progesteron selbst - zu untersuchen, während der Versuch A eine Aufnahmestudie darstellt mit dem Ziel, Unterschiede in der Aufnahme von Progesteron durch Prostata und Vesikulardrüse unter dem Einfluß der genannten Hormone und Hormonkombinationen herauszufinden.

Um die Wirkungen der Hypophysenhormone isoliert darstellen zu können, mußten zu allererst Bedingungen geschaffen werden, unter denen möglichst viele andere Parameter ausgeschaltet wurden. Das geschah durch Hypophysektomie und/oder Kastration: Hypophysektomie, um den Einfluß anderer Hypophysenhormone, insbesondere der Gonadotropine auszuschalten, Kastration, um das störende endogene Testosteron zu entfernen, da damit gerechnet werden mußte, daß Progesteron und Testosteron eventuell um Enzyme oder besonders um die erwähnten Rezeptoren im Kern konkurrieren würden.

Die Kastration schuf neue Probleme. Zwar sorgte die kurze biologische Halbwertzeit für eine rasche Ausscheidung des Testosterons, parallel hierzu aber setzte eine Verminderung der Hormonrezeptoren ein. Die Zeit zwischen operativem Eingriff und Injektion des radioaktiv markierten Progesterons bzw. Entnahme der Organe, die Vorbehandlungszeit also, während der Progesteron und/oder Hypophysenhormone substituiert wurden, mußte so gewählt werden, daß beiden Phänomenen Rechnung getragen wurde.

Bezüglich des Intervalls von 15 min zwischen Applikation des radioaktiv markierten Progesterons und Organentnahme konnte ich auf Vorarbeiten aus dem eigenen Arbeitskreis zurückgreifen. Erfahrungsgemäß genügt nämlich einerseits diese Zeit für die Resorption des subcutan injizierten Hormons und seine Metabolisierung, andererseits findet man nach 15 min noch relativ wenig von den für uns uninteressanten, quantitativ aber gewöhnlich überwiegenden hochpolaren Metaboliten.

Die hohe Metabolisierungsfähigkeit der Leber stellt insbesondere für Metabolisierungsuntersuchungen einzelner Organe eine Schwierigkeit dar, da man nie sicher ist, welche der in einem bestimmten Organ gefundenen Metabolite eventuell in der Leber entstanden und auf dem Blutweg in das Organ gelangt sind. Zum Vergleich wurde daher meist das Blut mit aufgearbeitet. - Für die Aufnahmestudie boten die Blutwerte eine Vergleichs- und Bezugsmöglichkeit, mit deren Hilfe unterschiedliche Resorptions- und Metabolisierungsgeschwindigkeiten, kurz: die individuellen Bedingungen der einzelnen Versuchstiere schlechthin, normiert werden konnten.

Die Verwendung von sowohl Tritium- als auch ^{14}C-markiertem Progesteron bei den Metabolitversuchen liegt in folgendem Widerspruch begründet: Einerseits war eine hohe spezifische Aktivität des Präparats (wie sie tritiertes Progesteron aufweist) erwünscht, um bei genügender Radioaktivitätsmenge stofflich nicht zu hoch dosieren zu müssen. Um die Verwendung des Scannings (s.u.) zu ermöglichen, waren andererseits energiereiche Teilchen erforderlich, wie sie ^{14}C ausstrahlt.

III) Experimenteller Teil

A) Methodik

1) Substanzen, Tiere, Vorbehandlung

Als Hypophysenhormone standen Präparate des "National Institute of Arthritis and Metabolic Deseases" in Bethesda, USA, zur Verfügung. Beide Hormone stammen aus Rinderhypophysen. Das Wachstumshormon (NIH-GH-B15) zeigte bei einer Überprüfung o,88 USP-U./mg (48,49). Die Verunreinigungen an TSH lagen bei o,o1o USP-U./mg (5o), die an LH bei o,o16 NIH-LH-S1-U./mg (51,52) und an FSH bei o,o1o NIH-FSH-S1-U./mg (53). Das Prolaktin (NIH-P-B3) mit einer Aktivität von 24,1 I.U./mg (54) enthielt ebenfalls Spuren von TSH (o,ooo2 USP-U./mg)(5o), LH (o,ooo5 NIH-LH-S1-U./mg)(51,52) und FSH (o,o4o NIH-FSH-S1-U./mg)(53), außerdem o,o1 USP-U./mg Wachstumshormon (48,49).

Daneben wurde ein älteres Mischpräparat(STH und Prolaktin aus Rinderhypophysen) der Schering-AG, Berlin, eingesetzt. Es enthielt 8,3 I.U. Prolaktin/mg, außerdem maximal o,58 USP-U. STH/mg. Der Gehalt an Wachstumshormon wurde nicht bestimmt. Eine discelektrophoretische Überprüfung mit den beiden reinen Hormonen des National Institute of Arthritis and Metabolic Deseases ergab jedoch, daß in dem Präparat der Schering-AG keine weiteren Proteine zugegen waren. Somit war es unseres Erachtens berechtigt, als STH-Gehalt des Schering-Präparates die Differenz zwischen Gesamtgewicht und dem bestimmten Anteil an Prolaktin einzusetzen. Die Kalkulation wurde wie folgt durchgeführt:

Reines Prolaktin enthält ..... 24,1 I.U./mg.
Das Schering-Präparat enthält .... 8,3 I.U./mg, also 34,4%.
Das heißt, sein STH-Gehalt ist maximal 65,6%
Reines STH hat ..... o,88 USP-U./mg. 65,6%
von o,88 USP-U./mg sind
o,58 USP-U./mg

Die beiden radioaktiv markierten Progesterone kamen von der englischen Firma "The Radiochemical Centre" in Amersham und hatten folgende spezifische Aktivitäten:

	Versuch A	Versuch B	Versuch C	Versuch D
Progesteron-4-^{14}C	nicht verwendet	60 mCi/mM 190 µCi/mg	60 mCi/mM 190 µCi/mg	60 mCi/mM 190 µCi/mg
Progesteron-7α-^{3}H	6,1 Ci/mM 19 mCi/mg	255 mCi/mM 810 µCi/mg	14,6 Ci/mM 46,5 mCi/mg	9,6 Ci/mM 30,6 mCi/mg

Tab.1: Spezifische Aktivitäten der in den Versuchen A bis D verwendeten radioaktiv markierten Progesterone (Progesteron-4-^{14}C und Progesteron-7α-^{3}H)

Die übrigen Steroide wurden teils entweder bei Steraloids, Inc., New York, oder bei Mann Research Laboratories, New York, gekauft, teils freundlicherweise von Herrn D. Gower, Biochemistry and Chemistry Department, Guy's Hospital Medical School, London, von Herrn R. Knuppen, Institut für klinische Biochemie, Bonn, und von der Firma Schering zur Verfügung gestellt.

Für die Steroide werde ich folgende Abkürzungen benutzen: P = Pregnan, A = Androstan. Ein Exponent neben P oder A bedeutet eine Doppelbindung, die von dem C-Atom, dessen Nummer im Exponent angegeben ist, zum C-Atom mit der nächsthöheren Nummer geht.

Beispiele:

P^{4}-3,2o-dion = Progesteron = Pregn-4-en-3,2o-dion = Δ4-Pregnen-3,2o-dion

5α-A-17β-ol-3-on = 5α-Dihydrotestosteron

Alle übrigen Substanzen und Lösungsmittel wurden bei der Firma Merck, Darmstadt, gekauft.

Für die Papierchromatogramme benutzten wir ausschließlich vorgereinigtes WHATMAN-II-Papier.

Bei der Dünnschichtchromatographie verwendeten wir verschiedene Träger und Schichtdicken:

1) Silica-Gel G mit Fluoreszenzindikator, o,25 mm
   Merck, Bestell-Nr. 5715
2) Silica-Gel G ohne Fluoreszenzindikator, o,1o mm
   Eastman/Kodack, Best.Nr. 6o61 oder K3o1R2

3) Polyamid	ohne Fluoreszenzindikator, o,12 mm Schleicher & Schüll, Best.Nr. F 16oo
4) Mikropolyamid	ohne Fluoreszenzindikator, o,o25 mm Schleicher & Schüll, Best.Nr. F 17oo
5) Aluminiumoxid T	ohne Fluoreszenzindikator, o,25 mm selbst beschichtet

Für alle Versuche wurden juvenile (2o-3o Tage alte), männliche CFHB-Ratten aus der Versuchstierzucht "Carworth Europe Laboratory" in Alconbury, Huntingdon, England, verwendet. Das Durchschnittskörpergewicht betrug 5o g bei den 28tägigen, 8o g bei den 33tägigen, wobei jeweils die vorbehandelten Tiere etwas schwerer als die Kontrolltiere, die orchidektomierten etwas schwerer als die hypophys-orchidektomierten Tiere waren.

Die Vorbehandlung der Tiere durch die Firma Schering war je nach Versuchstyp etwas anders.

Bei Versuch B wurden 8 Tiere am 22.Lebenstag orchidektomiert und vom 23. - 27. Tag mit 5 mg Progesteron pro Tier und Tag behandelt. Am 28. Lebenstag bekamen sie 15 min vor der Sektion 5,5 µCi (=29,2µg) Progesteron-4-^{14}C und 111,1 µCi (= 137,2 µg) Progesteron-7α-^{3}H (∑116,6 µCi = 166,4 µg), gelöst in o,2 ml Propylenglykol/Wasser im Volumenverhältnis 1/1, subcutan injiziert.

Bei Versuch C wurden zwei Gruppen zu je 9 Tieren gebildet. Die eine Gruppe wurde bis zum 27. Tag wie in Versuch B beschrieben behandelt ("Vorbehandelte"). Die andere Gruppe bekam vom 23.-27. Tag Lösungsmittel statt Progesteron ("Kontrollen"). Am 28. Tag erhielten alle Tiere 15 min vor der Sektion 7 µCi (= 36,85 µg) Progesteron-4-^{14}C, 93 µCi (= 2 µg) Progesteron -7α-^{3}H und 127,55 µg (∑1oo µCi; 166,4 µg) inaktives Progesteron, gelöst in o,1 ml Propylenglykol/Wasser (1/1). Bei Versuch D wurden 16 Tiere in zwei Gruppen eingeteilt. Am 22. Lebenstag wurden alle hypophysektomiert und orchidektomiert (HEORE). Vom 23.-27. Tag bekam die eine Gruppe 5 mg Progesteron und 4 mg (33,2 I.U. Prolaktin und ~2,32 USP-U. STH = 1,376 mg Prolaktin und ~2,624 mg STH) des Mischpräparates von Schering pro Tier und Tag, die andere Gruppe nur Lösungsmittel. Am 28. Tag erhielten alle Tiere 15 min

vor der Sektion subcutane Injektionen von 5,5 µCi (= 29,2µg) Progesteron-4-^{14}C und 111,1 µCi (= 3,6 µg) Progesteron-7α-^{3}H (116,6 µCi = 32,8 µg), gelöst in o,2 ml Propylenglykol/Wasser (1/1).

Bei Versuch A wurden 5o Tiere in 5 Gruppen zu je 1o Tieren eingeteilt und nach folgendem Schema vorbehandelt:

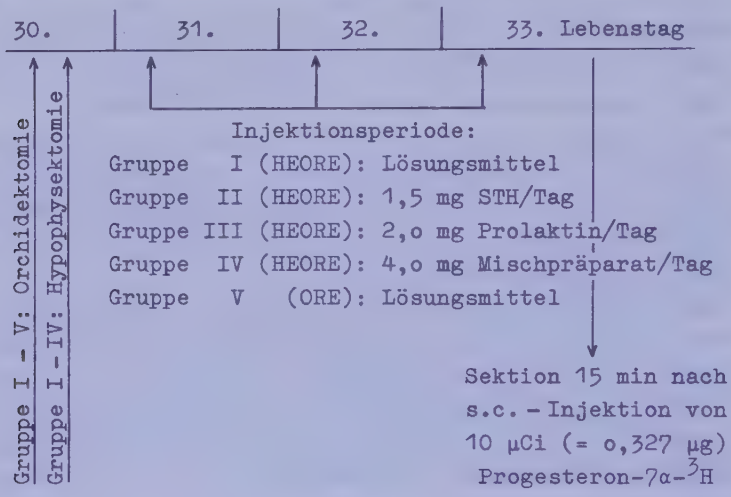


Abb. 4: Vorbehandlung der in Versuch A eingesetzten Ratten

STH (MG 48 ooo) ..... 3x1,5o mg = 94 nM
Prolaktin (MG 22 5oo) ..... 3x2,oo mg = 266 nM
Schering-Mischpräparat: STH ..... 3x2,62 mg = 164 nM
Prolaktin 3x1,38 mg = 183 nM

2) Aufarbeitung der Organe

Die in Äthernarkose dekapitierten Ratten wurden ausgeblutet und ca 2 sec in flüssigen Stickstoff getaucht. Bei der anschliessenden Sektion wurden unter Sicht einer Stereolupe die beiden Vesikulardrüsen und die beiden ventralen Prostatalappen entnommen. Die Kühlung sollte dabei gewährleisten, daß während der

ca 5 min in Anspruch nehmenden Präparation der Organe möglichst keine Stoffwechselvorgänge mehr abliefen.

Bei Versuch C und D wurde das von selbst aus den Halsschlagadern austretende Blut in Kristallisierschälchen aufgefangen, gefriergetrocknet und gewogen.

Prostata und Vesikulardrüsen wurden nach der Entnahme gewogen, tiefgefroren (festes CO_2), mit einem Kryomikrotom in 1o µm dicke Scheiben geschnitten und in zwei (einer für alle Prostatae von sämtlichen Tieren mit gleicher Vorbehandlung, einer entsprechend für alle Vesikulardrüsen) bzw. vier 1oo ml-Spitzkolben mit Schliff eingefüllt.

Bei Versuch D wurde als drittes Organ der Ductus deferens entnommen und wie Prostata oder Vesikulardrüse verarbeitet.

Blutproben und Organe gleicher Art und von Tieren mit gleicher Vorbehandlung wurden also bei Versuch B bis D "gepoolt", d.h. gemeinsam aufgearbeitet.

Bei Versuch A wurde das Blut jedes einzelnen Tieres in Liqueminbenetzten Zentrifugengläschen aufgefangen, gewogen und zentrifugiert. o,5 ml des Plasmas wurden zur Radioaktivitätsmessung entnommen. Die Organe Prostata und Vesikulardrüse wurden - ebenfalls für jedes Tier einzeln - auf Fließpapier abgetrocknet, dann gewogen und in 1 ml eines Hyamin/Toluol-(1/1)-Gemisches 24 h bei 5o°C in geschlossenen Radioaktivitätsmeßfläschchen (Vials) aufgelöst. Über die sich bei Versuch A unmittelbar anschließende Radioaktivitätsmessung siehe unter Absatz 5a !

Bei Versuch A wurde demnach nicht gepoolt, sondern - um statistische Aussagen zu ermöglichen - für jedes Tier und Organ je ein Meßwert angestrebt.

3) Extraktion der freien Metabolite

Die zerschnittenen Organe aus den Versuchen B bis D wurden in den erwähnten Spitzkolben in eine wäßrige und eine organische Phase getrennt. Zum Ausschütteln dienten 3o ml Wasser und dreimal 6o ml Dichlormethan. Die beiden Phasen wurden eingedampft, die Zellüberreste verworfen.

Das Blut der Versuche C und D wurde genauso behandelt, nur

mußte man hier nach jedem Schütteln zentrifugieren, um die beiden Phasen wieder voneinander zu trennen. Deshalb geschah das Ausschütteln des Blutes nicht in Spitzkolben, sondern in 2oo ml-Zentrifugengläsern mit Schliff.

4) Chromatographische Trennungen

Zur Übersichtstrennung der in der organischen Phase gelösten freien Metabolite des Progesterons wurde die absteigende Papierchromatographie mit System III nach BUSH (Heptan/Benzol/Methanol/Wasser = 66/33/8o/2o) benutzt. Hierbei wurde auf vorgereinigtes WHATMAN-II-Papier wie folgt aufgetragen:

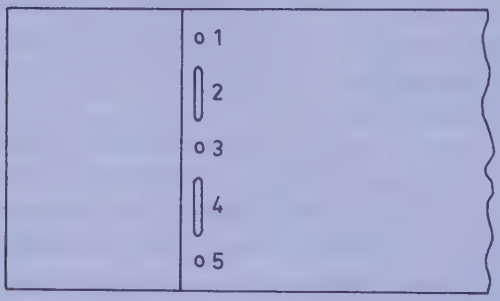


Abb. 5: Auftragen der freien Metabolite aus Prostata, Vesikulardrüse, Ductus deferens und Blut der Versuche B, C und D sowie der Referenzsubstanzen auf Whatman-II-Papier zur absteigenden Papierchromatographie

1: 10 µg A^4-3,17-dion
2: organische Phase von z.B. Prostata/Kontrollen sowie je 10 µg A^4-3,17-dion, P^4-17α-ol-3,20-dion und P^4-3,20-dion
3: 10 µg P^4-17α-ol-3,20-dion
4: organische Phase von z.B. Prostata/Vorbehandelte sowie je 10 µg A^4-3,17-dion, P^4-17α-ol-3,20-dion und P^4-3,20-dion
5: 10 µg P^4-3,20-dion

Wir wählten Δ^4-ungesättigte Steroide als Referenzsubstanzen, weil sie sich ohne Farbreaktion mit Hilfe der UV-Kontakt-Photographie nachweisen lassen. Dazu wird das fertige Chromatogramm auf Photopapier gelegt und UV-belichtet. Als weiße Aussparungen erscheinen nach dem Entwickeln die Referenzsubstanzen.

Mit Hilfe der aufsteigenden Dünnschichtchromatographie (TLC) trennten wir einzelne Peaks aus den Papierchromatogrammen weiter auf. Hierzu verwendeten wir die verschiedensten Träger und Laufmittelsysteme, um möglichst gute Trennergebnisse zu erzielen. Die wichtigsten sind nachfolgend aufgeführt:

zur Trennung von	System	Träger	Läufe
P1 - P6 - P9 - A2	Ch/EtAc = 90/10	3	1
P1 - P2 - P3 - P4 - A1 - A2 - A4 - A5 oder P1 - P2 - P9 - P11 oder P1 - P2 - P3 - P4 - P5 - P7 - P11	Ch/EtAc = 50/50	1	2
P4 - P7 - A1	Ch/EtAc = 50/50	5	2
P1 - P10 - P11	Ch/EtAc = 70/30	1	2
P1 - P2 - P3 - oder P9 - A2	Ch/EtAc/AcAc = 89/10/1	4	1
P1 - P5 oder P5 - A5	Cf/EtOH = 95/5	1	1
P2 - P3	Ch/Ac = 95/5	4	1
P4 - P5 - P6 oder P1 - P2 - P3 - P4 - P6 - P9	Bz/EtAc = 90/10	2	2
P5 - P6 - A2 - A3 - A6 - A7	Bz/EtAc = 90/10	2	3

Tab. 2: Dünnschichtchromatographiesysteme, die zur Auftrennung von einzelnen Steroiden verwendet wurden. Legende Seite 3o

Zeichenerklärung:

P1 = P^4-3,2O-dion	P10 = 5α-P -3α-ol-2O-on
P2 = 5α-P -3,2O-dion	P11 = 5α-P -3ß-ol-2O-on
P3 = 5ß-P -3,2O-dion	A1 = A^4-17ß-ol-3-on
P4 = P^4-17α-ol-3,2O-dion	A2 = 5α-A -17ß-ol-3-on
P5 = 5α-P -17α-ol-3,2O-dion	A3 = 5ß-A -17ß-ol-3-on
P6 = 5ß-P -17α-ol-3,2O-dion	A4 = A^4-3,17-dion
P7 = P^4-2Oα-ol-3-on	A5 = 5α-A -3,17-dion
P8 = 5α-P -2Oα-ol-3-on	A6 = 5ß-A -3α-ol-17-on
P9 = 5α-P -2Oß-ol-3-on	A7 = 5α-A -3ß-ol-17-on

Lösungsmittel:

Ac = Azeton; AcAc = Essigsäure; Bz = Benzol; Cf = Chloroform

Ch = Cyclohexan; EtAc = Äthylazetat; EtOH = Äthanol absolut

Träger:

1 = Silica-Gel G mit Floureszenzindikator, o,25 mm

2 = Silica-Gel G, o,1 mm

3 = Polyamid, o,12 mm

4 = Mikropolyamid, o,o25 mm

5 = Aluminiumoxid T, o,25 mm

Vergleiche zwischen Dünnschichtchromatogrammen verschiedenen Entstehungsdatums sind nur möglich, wenn folgende"Standardbedingungen" eingehalten werden:

1. Tankgröße, z.B. 22x22x7 cm
2. Tankauskleidung mit Filterpapier
3. Vor dem ersten Lauf mindestens 3 h Wartezeit, damit eine gesättigte Atmosphäre entstehen kann
4. Der Laufmittelspiegel soll 1 cm hoch sein. Das entspricht bei der angegebenen Tankgröße einem Laufmittelvolumen von 2oo ml.
5. Die Temperatur muß konstant gehalten werden, üblicherweise auf 23°C.
6. Der Winkel, den die Dünnschichtplatte mit der Laufmitteloberfläche bildet, muß zwischen 8o und 1oo° liegen.
7. Die Substanzen müssen auf einer gedachten Linie, 2,5 cm vom unteren Rand der Platte entfernt, aufgetragen werden.
8. Das Laufmittel sollte bei jedem Lauf gleichweit laufen, z.B. 15 cm, gerechnet von der Auftragstelle an.

Über Gaschromatographie siehe unter 5d !

5) Radioaktivitätsmessungen

Zur Messung der Radioaktivität benutzten wir zwei Methoden: die Flüssig-Szintillations-Spektrometrie (LSS) und das Radiopapier- und -dünnschicht-Scanning. Die LSS beruht auf dem Prinzip, daß von Nukliden ausgestrahlte Teilchen (in unserem Fall ß-Strahlen) durch einen Szintillator in Photonen umgewandelt werden. Jedes ß-Teilchen ruft einen Lichtblitz hervor, der, von einem Photomultiplier verstärkt, gezählt wird. Das Meßergebnis wird in counts per minute (cpm) angegeben. Als Szintillatoren dienten PPO und Dimethyl-POPOP in Toluol gelöst und "Instagel" von Packard Instruments. Für jeden benutzten Szintillator mußte eine eigene Eichkurve angefertigt werden, mit deren Hilfe die gemessenen cpm - nach Subtraktion des Backgrounds - in die tatsächlichen Zerfälle pro Minute (dpm) umgerechnet werden konnten.

Beim Scanning wird das radioaktive Material (z.B. ein Radiopapierchromatogramm) an einem unter Hochspannung stehenden Zähldraht, der sich in einer methandurchströmten Kammer befindet, vorbeigefahren. Jedes am Zähldraht (Anode) ankommende Teilchen wird als elektrischer Impuls registriert, über die Zeit integriert und auf einem in cpm geeichten Ampêremeter sichtbar. Über einen angeschlossenen Schreiber erhält man eine Kurve, deren Abszisse in cm und deren Ordinate in cpm geeicht ist.

a) Bestimmung der Organ-Gesamtaktivitäten mit Hilfe der Flüssig-Szintillations-Spektrometrie

Nach der in Absatz 3 beschriebenen Extraktion der freien Metabolite wurde die organische Phase in 1ml Dichlormethan, die wäßrige Phase in 5ml Wasser aufgenommen. Jeweils ein Zehntel davon wurde zu einem Szintillatorgemisch in ein Vial pipettiert und nach der oben beschriebenen Methode 1o min lang gemessen. Die Gesamtaktivität der Organe errechnet sich nur ungenau durch Addition der Ergebnisse der organischen und wäßrigen Phase, da die unlöslichen Zellüberreste, die ja auch radioaktive Stoffe enthalten können, nicht mitgemessen wurden.

Nur bei Versuch A, wo es darauf ankam, die genaue Gesamtakti-

vität jedes einzelnen Organs zu ermitteln, wurden die Organe sofort nach der Entnahme (s.o., Absatz 2) aufgelöst, mit Szintillatorgemisch versetzt und gemessen. Die o,5 ml Plasma wurden mit Instagel als Szintillator gemessen, weil hier keine unlöslichen Strukturen vorlagen.

b) Bestimmung des Radioaktivitätsgehalts der Einzelmetabolite mit Hilfe der Radiopapierchromatographie oder der Flüssig-Szintillations-Spektrometrie

Die beim Scanning erhaltene Kurve ermöglicht eine ungefähre Beurteilung des Radioaktivitätsgehalts der einzelnen Peaks durch die Berechnung ihres Flächeninhalts. Auch das Ausschneiden und Auswiegen der Peaks erlaubt bei vorheriger Eichung eine Berechnung des Radioaktivitätsgehalts. Genauer wird die Messung, wenn man den Bereich eines Peaks aus einem Chromatogramm herausschneidet, vollständig eluiert und im LSS die Radioaktivität bestimmt. Des weiteren machten wir von der Möglichkeit Gebrauch, ein Papierchromatogramm quer zur Laufrichtung in 1 cm-breite Streifen zu zerschneiden und die Radioaktivität jedes einzelnen Streifens im LSS zu messen. Aus den einzelnen Werten kann man eine Kurve zusammenstellen, wie sie der Kurve des Scanners entspricht, und hat gleichzeitig den Radioaktivitätsgehalt der verschiedenen Peaks. Diese Methode ist wesentlich empfindlicher als das Scanning, liefert also noch Kurven bei sehr niedrigem Radioaktivitätsgehalt, hat aber den Nachteil, daß das Material hinterher nicht mehr verwendet werden kann, da eine Trennung der winzigen stofflichen Menge der radioaktiven Steroide von den Szintillatoren bis jetzt noch nicht befriedigend möglich ist.

c) Identifizierung der Metabolite mit Hilfe der Rekristallisation bis zur konstanten Spezifischen Aktivität (Isotopen-Verdünnungs-Technik, IVT)

Bei dieser Methode werden zwei Phänomene ausgenutzt: 1. Die Löslichkeit einer Substanz ist von der Temperatur abhängig, 2. Kristalle bestehen (bis auf wenige Ausnahmen) nur aus einer Substanz. Ein Peak aus einem Chromatogramm wird eluiert und sein Radioaktivitätsgehalt bestimmt. Dann fügt man eine bestimmte Menge (z. B. 20 mg) des vermuteten Metabolits in nicht-radioaktiver Form

hinzu und kristallisiert um. Nach Zentrifugation in der Kälte werden die Kristalle von der Mutterlauge getrennt (s.u.), und in beiden wird die spezifische Aktivität gemessen. Vier bis sechs weitere Umkristallisationen folgen. An der Entwicklung der spezifischen Aktivität des Kristallisats kann man ablesen, ob die hinzugefügte Substanz mit der in dem Peak enthaltenen, vermuteten identisch ist oder nicht. Wenn die spezifische Aktivität des Kristallisats auf einen konstanten Wert zusteuert, sind durch die wiederholten Rekristallisationen alle übrigen, eventuell vorhandenen radioaktiven Substanzen in die Mutterlauge überführt worden, und die im Kristallisat verbleibende Radioaktivität muß mit der zugefügten, nicht-radioaktiven Substanz identisch sein. Fällt die spezifische Aktivität des Kristallisats dagegen mehr oder weniger kontinuierlich ab, war die Vermutung falsch, die Substanz eine andere.

Im Verlauf der Anwendung dieser komplizierten Methode wurde es notwendig, eine Apparatur zu konstruieren, die geeignet war, den methodischen Fehler möglichst klein zu halten.

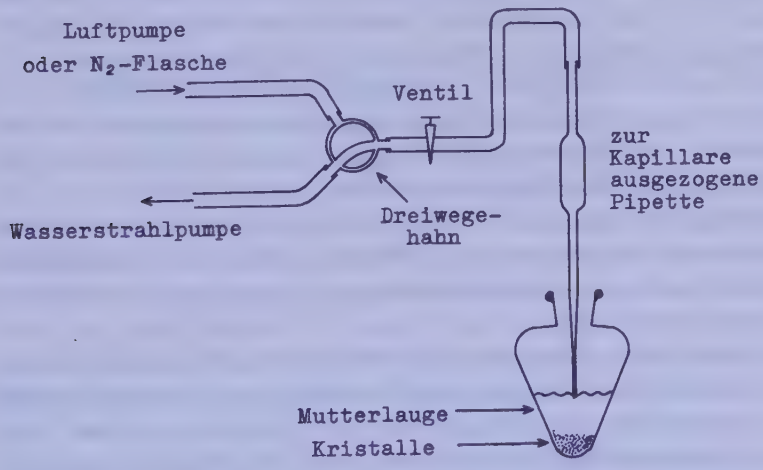


Abb. 6: Apparatur zur schonenden Absaugung der Mutterlauge bei der Isotopenverdünnungstechnik

Zum Absaugen der Mutterlauge nach dem Umkristallisieren und Zentrifugieren wird das Ventil zunächst ganz geöffnet, dann das Spitzkölbchen an die festmontierte Pipette von unten so herangeführt, daß die Spitze der Kapillare gerade in die Mutterlauge eintaucht. Dann schließt man das Ventil langsam und hebt das Kölbchen, dem sinkenden Flüssigkeitsspiegel folgend.
Das hat folgende Vorteile:

1. Die abzentrifugierten Kristalle werden nicht durch unnötige Bewegungen wieder aufgewirbelt.
2. Der Absaugdruck kann niedrig gehalten werden, so daß im Idealfall keine Kristalle mitgesaugt werden.

Kurz vor Beendigung des Absaugvorganges wird das Ventil wieder geöffnet (der letzte Tropfen Mutterlauge wird dann meist trotzdem noch angesaugt), das Kölbchen abgestellt und die Mutterlauge nach Umlegen des Dreiwegehahnes in ein bereitgestelltes Gefäß geblasen.

Hieran anschließend und vor dem nächsten Umkristallisieren werden die Kristalle ein- bis zweimal mit einem Lösungsmittel "gewaschen", in dem die vermutete Substanz nur schwer löslich ist (Beispiel: Progesteron - Oktan). Das Lösungsmittel (etwa 1 ml) wird in das Spitzkölbchen pipettiert, dann wird geschüttelt, in der Kälte zentrifugiert und erneut vorsichtig abgesaugt wie beschrieben. Die Waschflüssigkeit gehört zur Mutterlauge und wird deshalb in dasselbe Gefäß geblasen wie jene.

Die Frage des optimalen Lösungsmittelgemisches für die Umkristallisierung und das Umkristallisieren selbst stellte ebenfalls ein Problem dar. Die besten Erfahrungen machten wir schließlich mit folgendem Vorgehen:

1. Jeder Umkristallisierungsvorgang wird mit einem anderen, jedoch immer für die jeweilige Substanz typischen Lösungsmittelgemisch durchgeführt.
2. Die Reihenfolge richtet sich nach der Polarität der Lösungsmittel.
3. Es wird immer zuerst das Lösungsmittel zugegeben, in dem die Substanz gut löslich ist, und zwar soviel, bis sie

vollständig gelöst ist. Dann wird in der Wärme eingedampft, bis erste Zeichen einer Sättigung sichtbar werden. Erst jetzt werden einige Tropfen des anderen Lösungsmittels zugegeben, in dem die Substanz schlecht löslich ist. Hierauf folgt Kühlung und Zentrifugation in der Kälte.

Beispiel:

für die Umkristallisierung von 5α-P-3α-ol-2o-on

Aceton - n-Heptan oder Dioxan - H_2O oder Methanol - H_2O

Die exakte Messung der spezifischen Aktivität von Kristallisat und Mutterlauge war wegen der sehr kleinen Substanzmengen sehr schwierig. Ursprünglich verfuhren wir so, daß ein Aliquot 24 h über P_2O_5 und Paraffin und unter Vakuum getrocknet, dann möglichst schnell gewogen und die Radioaktivität gemessen wurde. Trotz dieses aufwendigen Verfahrens blieb der methodische Fehler groß. Erst als wir die Waage durch die Gaschromatographie ersetzten, wurden die Meßwerte weniger unstet. Es wurde hierdurch auch möglich, die Umkristallisationen statt im lo mg-Bereich im 1 mg-Bereich durchzuführen. Das hatte nicht nur finanzielle Vorteile, sondern verringerte auch - wenn auch nur wenig - die Gefahr der Bildung von Einschlußkristallen.

d) Identifizierung der Metabolite mit Hilfe der präparativen Radiogaschromatographie

Da sich die Gaschromatographie durch eine hohe Trennleistung, Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit auszeichnet, war sie für uns vor allem in zwei Situationen wichtig: Wenn die zu identifizierenden Metabolite in nur sehr geringen Radioaktivitätsmengen auftraten und wenn eine größere Anzahl von Einzelmetaboliten zu erwarten war, die papier- oder dünnschichtchromatographisch nicht in einem System zu trennen waren.

Die zu identifizierenden oder zu trennenden Substanzen (z.B. das Eluat eines Papierchromatographischen Peaks) werden in Lösung - zusammen mit den infrage kommenden nicht radioaktiven Referenzsubstanzen - auf eine Säule aufgetragen, dort bei ca. 270°C sofort verdampft und bei 240°C von einem Treibgas verschieden schnell durch die Säule transportiert. Am Säulenausgang werden die Substanzen in einem Flammenionisationsdetektor (FID)

verbrannt, der hierbei fließende Strom verstärkt und durch ein Ampêremeter (=Schreiber) sichtbar gemacht. Durch ein "splitting" des Gasstroms am Säulenausgang ist es möglich, einen Teil der austretenden Substanzen unverbrannt aufzufangen und deren Radioaktivität im Flüssigszintillationsspektrometer zu messen. Man erhält bei Fraktionierung des Gasstroms auf diese Art zwei Kurven: Eine vom Schreiber des Gaschromatographen, die die Lage der einzelnen Substanzen anzeigt, und eine andere, die den Radioaktivitätsgehalt des Gasstroms angibt. Eine Zuordnung beider Kurven zueinander ermöglicht die Identifizierung der radioaktiven Substanzen. (Vgl.Abb. 14, S. 51).

Einzelheiten über diese von GOLLMER (59) entwickelte Methode sind in dessen ebenfalls in diesem Jahr erscheinenden Inauguraldissertation nachzulesen.

B) Ergebnisse

1) Wirkungen von STH und Prolaktin auf die Aufnahme von radioaktiv markiertem Progesteron in Prostata und Vesikulardrüse (Versuch A)

Gruppe I	78,9 ± 2,67 g
Gruppe II	90,7 ± 2,76 g
Gruppe III	78,8 ± 3,78 g
Gruppe IV	84,1 ± 3,42 g
Gruppe V	83,1 ± 2,05 g
Gruppe I-V	83,1 ± 1,53 g

Tab. 3: Körpergewichte (arithmetisches Mittel ± Standardabweichung) der in Versuch A eingesetzten Ratten (Vorbehandlung vgl. Abb. 4, S. 26)

Tab. 4: Gewichte von Prostata und Vesikulardrüse (Einzelwerte, arithmetisches Mittel ± Standardabweichung in mg) der in Versuch A eingesetzten Ratten (Vorbehandlung vgl. Abb. 4, S. 26)
*: Dieser Wert konnte nicht benutzt werden, da das zugehörige Tier eine unversehrte Hypophyse hatte, wie sich bei der Routinekontrolle zeigte.

Tab. 5: Relativer Radioaktivitätsgehalt von Prostata und Vesikulardrüse (Einzelwerte, arithmetisches Mittel ± Standardabweichung) der in Versuch A eingesetzten Ratten (Vorbehandlung vgl. Abb. 4, S. 26). Berechnung:

$$\frac{\text{dpm/mg Organ x 100}}{\text{dpm/µl Plasma}}$$

*: Dieser Wert ist nach den Regeln der Statistik als "Ausreisser" vernachlässigbar.
**: Dieser Wert konnte nicht benutzt werden, da die Inkubationszeit bei diesem Tier versehentlich 27 min betrug.
***: Dieser Wert konnte nicht benutzt werden, da die Inkubationszeit bei diesem Tier versehentlich 3 min betrug.

Tab. 4

	Prostata		Vesikulardrüse	
	Einzelwerte	A.M. ± St.A.	Einzelwerte	A.M. ± St.A.
Gruppe I	2o,89 18,5o 21,41 12,61 19,34 21,oo 16,86 23,42 19,oo 24,48	19,751 mg ± 1,o7o	7,o6 9,36 6,33 8,21 8,43 8,97 5,59 5,99 7,o4 1o,63	7,761 mg ± o,514
Gruppe II	25,16 22,o1 19,59 18,86 16,95 19,88 25,75 21,8o 25,46 19,35	21,481 mg ± o,977	7,46 7,26 7,94 6,72 7,91 7,91 6,o2 6,71 7,41 9,1o	7,444 mg ± o,27o
Gruppe III	13,89 2o,95 19,43 18,74 18,o2 15,68 14,63 17,28 16,98 26,13 17,67	18,127 mg ± 1,o22	8,59 7,74 6,46 8,51 3,56 7,o5 7,8o 7,78 8,5o 11,86 8,89	7,885 mg ± o,454
Gruppe IV	22,79 16,62 (33,39)* 18,3o 24,18 18,15 23,21 15,oo 25,34 16,93 26,74	2o,726 mg ± 1,316	8,o9 8,94 (8,9o)* 8,25 1o,52 8,13 8,o2 1o,14 9,96 5,89 9,48	8,742 mg ± o,433
Gruppe V	23,58 18,46 2o,63 15,53 19,34 22,7o 19,8o 23,99 34,64 25,oo	22,367 mg ± 1,641	6,51 8,33 7,24 7,o5 5,26 6,62 8,53 6,71 9,23 7,72	7,32o mg ± o,367

Tab. 5

	Prostata		Vesikulardrüse	
	Einzelwerte	A.M. ± St.A.	Einzelwerte	A.M. ± St.A.
Gruppe I	33,6 (8,4)* 44,9 64,8 23,o 51,3 – 44,o 33,3 4o,1	41,8 ± 4,5	37,6 (5,7)* 48,2 68,8 21,1 59,8 – 49,1 32,2 38,2	44,4 ± 5,4
Gruppe II	48,4 74,5 75,o 6o,1 68,7 58,1 47,4 7o,4 56,o 53,8	61,26 ± 3,26	45,2 58,6 72,o 58,7 61,2 57,8 6o,3 62,6 66,9 57,8	6o,11 ± 2,2
Gruppe III	31,6 46,9 45,6 53,7 5o,8 53,4 56,9 35,6 53,3 38,o 54,8	47,3 ± 2,6	34,4 41,5 63,5 53,3 (112,7)* 52,8 55,5 38,1 48,4 53,3 53,9	49,5 ± 2,8
Gruppe IV	1o5,8 68,1 (57,5)** 94,5 64,8 67,7 57,o 77,7 57,5 77,6 58,3	72,9 ± 5,2	82,3 65,3 (55,o)** 95,8 82,3 62,8 57,8 71,6 64,3 7o,o 58,7	71,1 ± 3,8
Gruppe V	(488,9)* 75,o (16,3)*** 44,5 57,2 57,5 46,4 49,1 6o,3 36,5	53,3 ± 4,2	(323,6)* 55,7 (22,7)*** 38,5 5o,4 45,5 44,4 45,o 52,3 43,o	46,9 ± 2,o

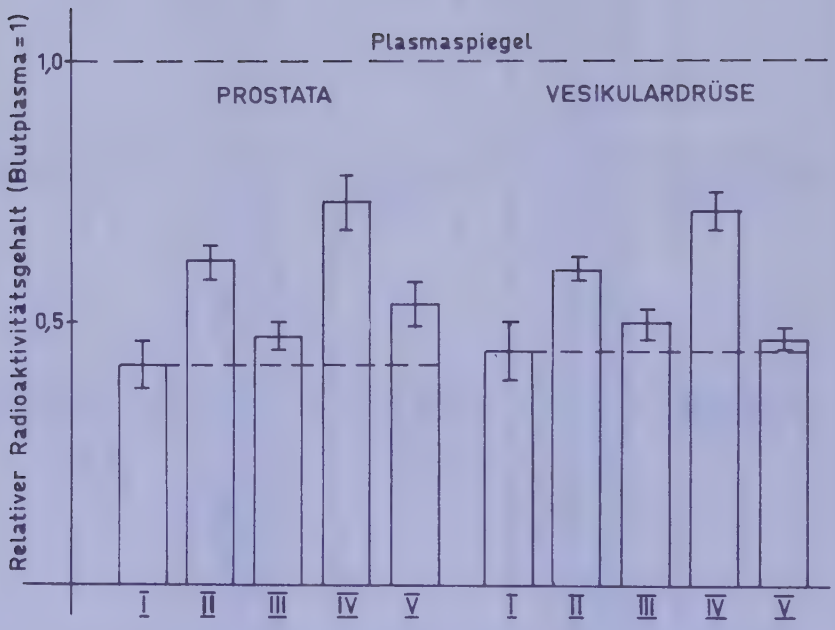


Abb. 7: Zusammenfassende, graphische Darstellung der Ergebnisse von Versuch A: Radioaktivitätsgehalt pro Gewichtseinheit in Relation zum Blutplasma (=1), 15 min nach s.c. Injektion von 10 µCi (o,327 µg) Progesteron-7α-^{3}H in 33 Tage alte CFHB-Ratten (10 Tiere pro Gruppe). Vorbehandlung siehe Abb. 4, S. 26!

I : HEORE, Lösungsmittelkontrollen
II : HEORE, mit STH vorbehandelt
III: HEORE, mit Prolaktin vorbehandelt
IV : HEORE, mit Mischpräparat (STH + Prolaktin) vorbehandelt
V : ORE, Lösungsmittelkontrollen

	Prostata			Vesikulardrüse		
Gruppe	Aufnahme (AM ± StA)	Effekt (%)	p-Wert	Aufnahme (AM ± StA)	Effekt (%)	p-Wert
I	41,8 ± 4,5			44,4 ± 5,4		
II	61,3 ± 3,3	46,2	<0,0025	60,1 ± 2,2	35,5	<0,01
III	47,3 ± 2,6	13,0	<0,2>0,5	49,5 ± 2,8	11,5	<0,25>0,2
IV	72,9 ± 5,2	74,1	<0,0005	71,1 ± 3,8	60,2	<0,0025
V	53,3 ± 4,2	27,3	<0,05	46,9 ± 2,0	5,6	<0,35>0,3

Tab. 6: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse von Versuch A in Zahlen. Vergleiche Legende zu Abb. 7, S. 40! Aufnahme (arithmetisches Mittel ± Standardabweichung) = Radioaktivitätsgehalt pro mg Organ x 100 in Relation zum Radioaktivitätsgehalt je µl Blutplasma. Bei der Berechnung des Effekts wurden die Ergebnisse der Gruppe I (HEORE Lösungsmittelkontrollen) als 100% definiert.

Einen signifikanten Unterschied zwischen Prostata und Vesikulardrüse innerhalb einer Vorbehandlungsgruppe gab es nur in der Gruppe der Orchidektomierten Lösungsmittelkontrollen (Gruppe V). Der p-Wert ist kleiner als 0,05.

2) Metabolitspektren von Progesteron (Versuche B - D)

a) bei orchidektomierten mit und ohne Progesteronvorbehandlung (Versuche B und C)

Versuch B	Vorbehandelte	39,1 ± 0,7 g
Versuch C	Vorbehandelte	62 g
	Kontrollen	55 g

Tab. 7: Körpergewichte (arithmetisches Mittel ± Standardabweichung) der in Versuch B und C eingesetzten, 28 Tage alten CFHB-Ratten (zur Vorbehandlung vergleiche den methodischen Teil, S. 25!)

Prostata		Vesikulardrüse	
Einzelwerte	Arithm. Mittel	Einzelwerte	Arithm. Mittel
6,78	15,9	5,35	5,12
9,26		4,02	
17,47		4,96	
17,37		5,32	
21,16		5,71	
16,88		4,77	
18,40		5,55	
20,25		5,30	

Tab. 8: Gewichte von Prostata und Vesikulardrüse (Einzelwerte und arithmetisches Mittel in mg) der in Versuch B eingesetzten Ratten (Vorbehandlung siehe S. 25!)

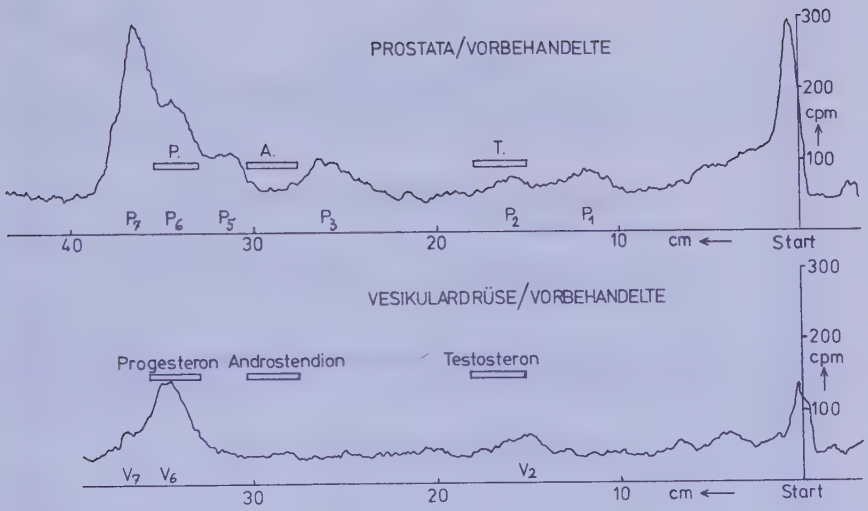


Abb. 8: Radiopapierchromatogramme der Progesteronmetabolite einschließlich Progesteron aus Prostata und Vesikulardrüse 28 Tage alter orchidektomierter CFHB-Ratten, 15 min nach s.c. Injektion von 116,6 µCi (166,4 µg) ^{3}H- und ^{14}C-Progesteron. Orchidektomie am 22. Lebenstag, vom 23. - 27. Lebenstag tägliche Dosen von 5 mg Progesteron (siehe Methodik, S. 25, Versuch B). - Whatman-II, Heptan/Benzol/Methanol/Wasser = 66/33/80/20, 3 Stunden, absteigend.

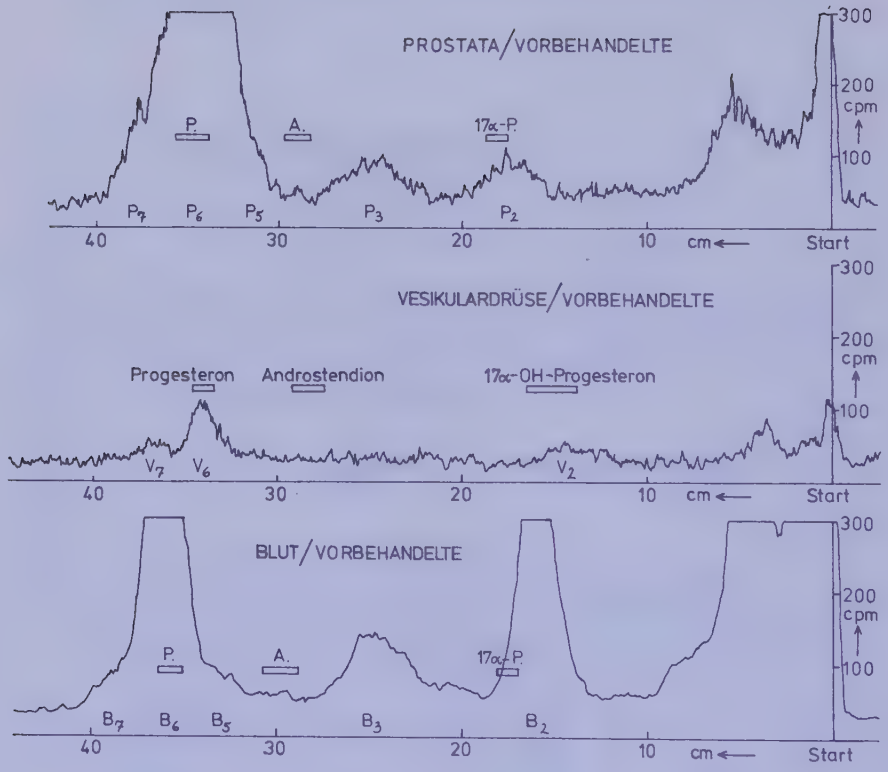


Abb. 9: Radiopapierchromatogramme der Progesteronmetabolite einschließlich Progesteron aus Prostata, Vesikulardrüse und Blut 28 Tage alter, orchidektomierter CFHB-Ratten, 15 min nach s.c. Injektion von 100 µCi (166,4 µg) ^{3}H- und ^{14}C-Progesteron. Orchidektomie am 22. Lebenstag, vom 23. - 27. Lebenstag tägliche Dosen von 5 mg Progesteron (siehe Methodik, S. 25, Versuch C). - Whatman-II, Heptan/Benzol/Methanol/Wasser = 66/33/80/20, 3 Stunden, absteigend.

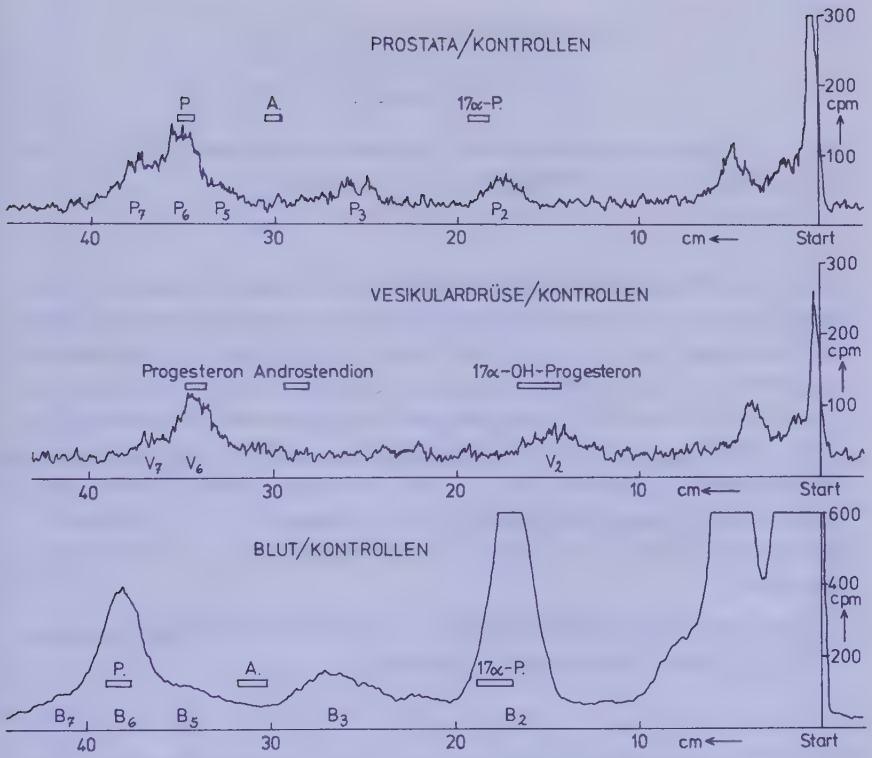


Abb. 10: Radiopapierchromatogramme der Progesteronmetabolite einschließlich Progesteron aus Prostata, Vesikulardrüse und Blut 28 Tage alter, orchidektomierter CFHB-Ratten, 15 min nach s.c. Injektion von 100 µCi (166,4 µg) ^{3}H- und ^{14}C-Progesteron. Orchidektomie am 22. Lebenstag, vom 23. - 27. Lebenstag tägliche Lösungsmittelinjektionen (siehe Methodik, S. 25, Versuch C). - Whatman-II, Heptan/Benzol/Methanol/Wasser = 66/33/80/20, 3 Stunden, absteigend.

b) bei hypophys-orchidektomierten mit und ohne Progesteron-, STH- und Prolaktin-Vorbehandlung (Versuch D)

Vorbehandelte	50 - 60 g
Kontrollen	40 - 50 g

Tab. 9: Körpergewichte der in Versuch D eingesetzten, 28 Tage alten CFHB-Ratten (Vorbehandlung siehe S. 25!)

Abb. 11: Radiopapierchromatogramme der Progesteronmetabolite einschließlich Progesteron aus Prostata, Vesikulardrüse, Ductus deferens und Blut 28 Tage alter, hypophys-orchidektomierter CFHB-Ratten, 15 min nach s.c. Injektion von 116,6 µCi (32,8 µg) ^{3}H- und ^{14}C-Progesteron. Hypophys-orchidektomie am 22. Lebenstag, vom 23. - 27. Lebenstag tägliche Dosen von 5 mg Progesteron, 1,376 mg (33,2 I.U.) Prolaktin und 2,624 mg (2,32 USP-U.) STH (siehe Methodik, S. 25, Versuch D). - Whatman-II, Heptan/Benzol/Methanol/Wasser = 66/33/80/20, 3 Stunden, absteigend.

*: Radioaktivitätsmessung von 1 cm-Streifen im Flüssig-Szintillations-Spektrometer (Packard)

Abb. 12: Radiopapierchromatogramme der Progesteronmetabolite einschließlich Progesteron aus Prostata, Vesikulardrüse, Ductus deferens und Blut 28 Tage alter, hypophys-orchidektomierter CFHB-Ratten, 15 min nach s.c. Injektion von 116,6 µCi (32,8 µg) ^{3}H- und ^{14}C-Progesteron. Hypophys-orchidektomie am 22. Lebenstag, vom 23. - 27. Lebenstag tägliche Lösungsmittelinjektionen (siehe Methodik, S. 25, Versuch D). - Whatman-II, Heptan/Benzol/Methanol/Wasser = 66/33/80/20, 3 Stunden, absteigend.

*: Radioaktivitätsmessung von 1 cm-Streifen im Flüssig-Szintillations-Spektrometer (Packard)

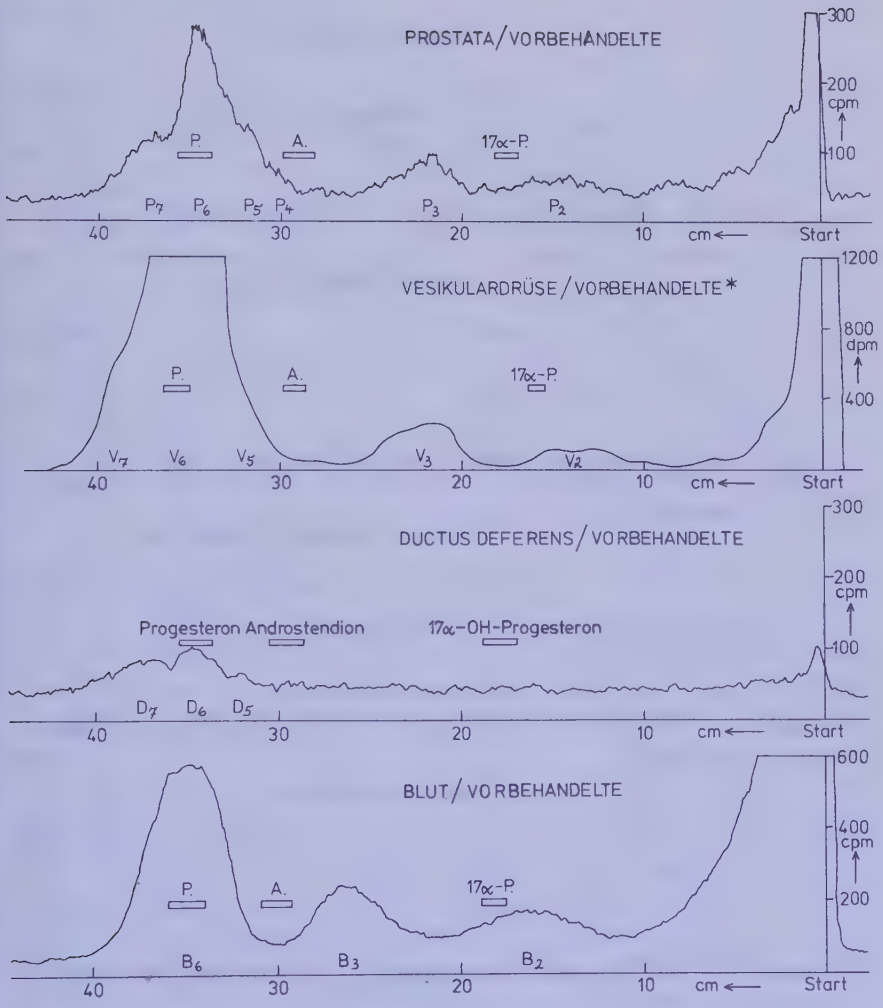

PROSTATA/VORBEHANDELTE
300
200
cpm
100
P.
A.
17α-P.
P7 P6 P5 P4 P3 P2
40 30 20 10 cm ← Start
VESIKULARDRÜSE/VORBEHANDELTE*
1200
800
dpm
400
P.
A.
17α-P.
V7 V6 V5 V3 V2
40 30 20 10 cm ← Start
DUCTUS DEFERENS/VORBEHANDELTE
300
200
cpm
100
Progesteron Androstendion
17α-OH-Progesteron
D7 D6 D5
40 30 20 10 cm ← Start
BLUT/VORBEHANDELTE
600
400
cpm
200
P.
A.
17α-P.
B6 B3 B2
40 30 20 10 cm ← Start

Abb. 11

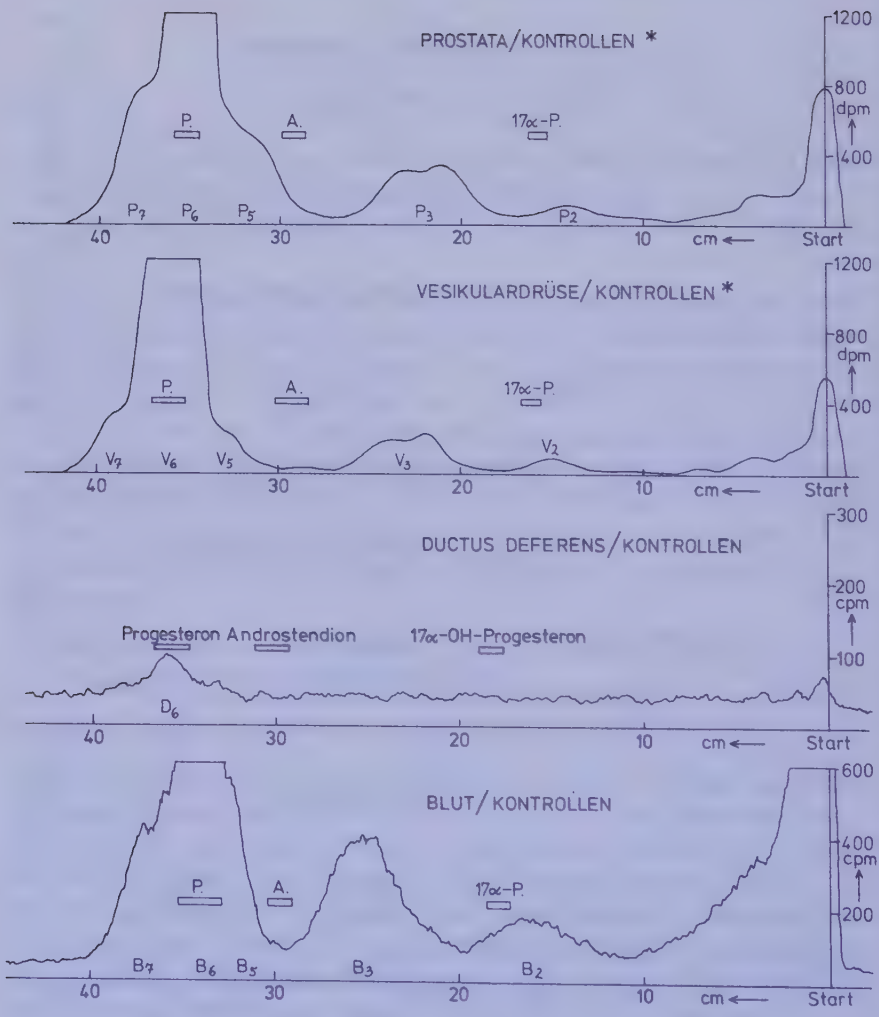

PROSTATA/KONTROLLEN *
1200
800
dpm
400
P.
A.
17α-P.
P7
P6
P5
P3
P2
40
30
20
10
cm ←
Start
VESIKULARDRÜSE/KONTROLLEN *
1200
800
dpm
400
P.
A.
17α-P.
V7
V6
V5
V3
V2
40
30
20
10
cm ←
Start
DUCTUS DEFERENS/KONTROLLEN
300
200
cpm
100
Progesteron
Androstendion
17α-OH-Progesteron
D6
40
30
20
10
cm ←
Start
BLUT/KONTROLLEN
600
400
cpm
200
P.
A.
17α-P.
B7
B6
B5
B3
B2
40
30
20
10
cm ←
Start

Abb. 12

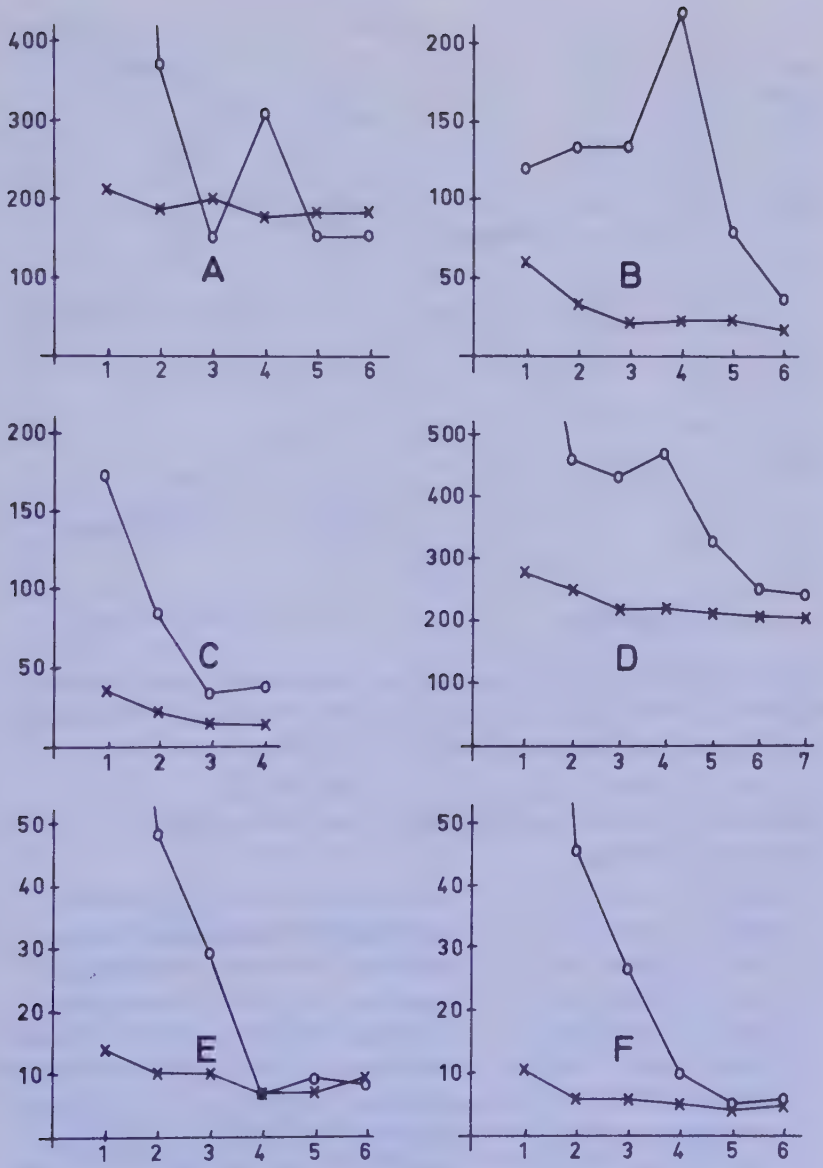


Abb. 13: Legende siehe folgende Seite!

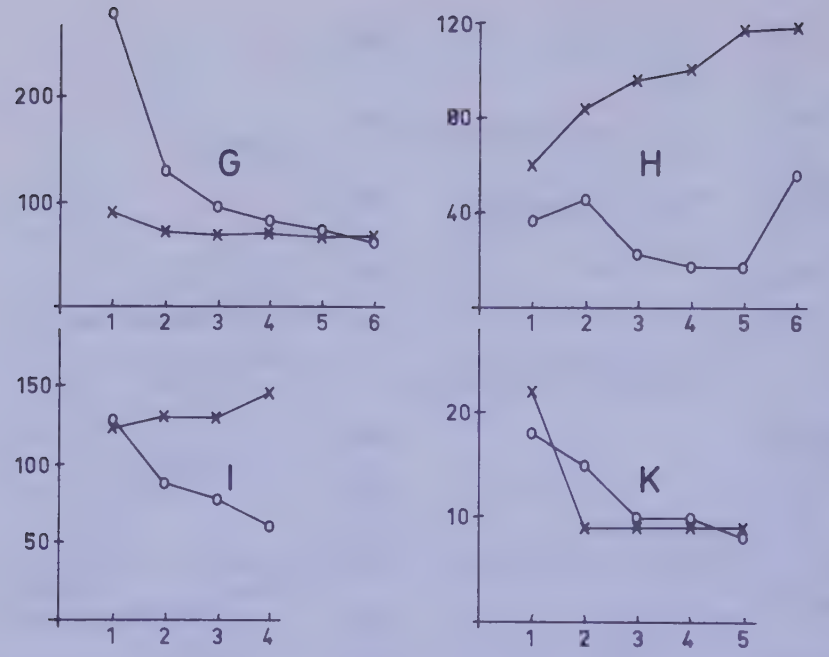


Abb. 13: Rekristallisation bis zur konstanten spezifischen Aktivität (IVT, s.S. 32) mit einzelnen "Peaks" aus Papierchromatogrammen der Versuche B und D (vgl. Abb. 8 und 11)

x = Kristallisat o = Mutterlauge
Abszissen = Anzahl der Rekristallisationsvorgänge
Ordinaten = cpm/mg

A: Peak V_6 (Abb. 8), zugefügt 2o,622 mg Progesteron
B: Peak V_2 (Abb. 8), zugefügt 19,876 mg 17α-OH-Prog.
C: Peak P_2 (Abb. 8), zugefügt 2o,oo1 mg 17α-OH-Prog.
D: Peak P_6 (Abb. 8), zugefügt 2o,o37 mg Progesteron
E: Peak P_7 (Abb. 8), zugefügt 19,617 mg 5ß-P-3,20-dion
F: Peak P_7 (Abb. 8), zugefügt 2o,262 mg 5α-P-3,20-dion
G: Peak P_7 (Abb. 11), zugefügt 2o,48o mg 5α-P-3,20-dion
H: Mutterlaugen von IVT G, zugefügt 2o,oo7 mg Progesteron
J: Peak P_7 (Abb. 11), zugefügt 2o,633 mg 5ß-P-3,20-dion
K: Peak P_7 (rechromatographiert in Cyclohexan/Aceton = 95/5 auf 12o µm Polyamid), zugefügt 2o,471 mg 5ß-P-3,20-dion

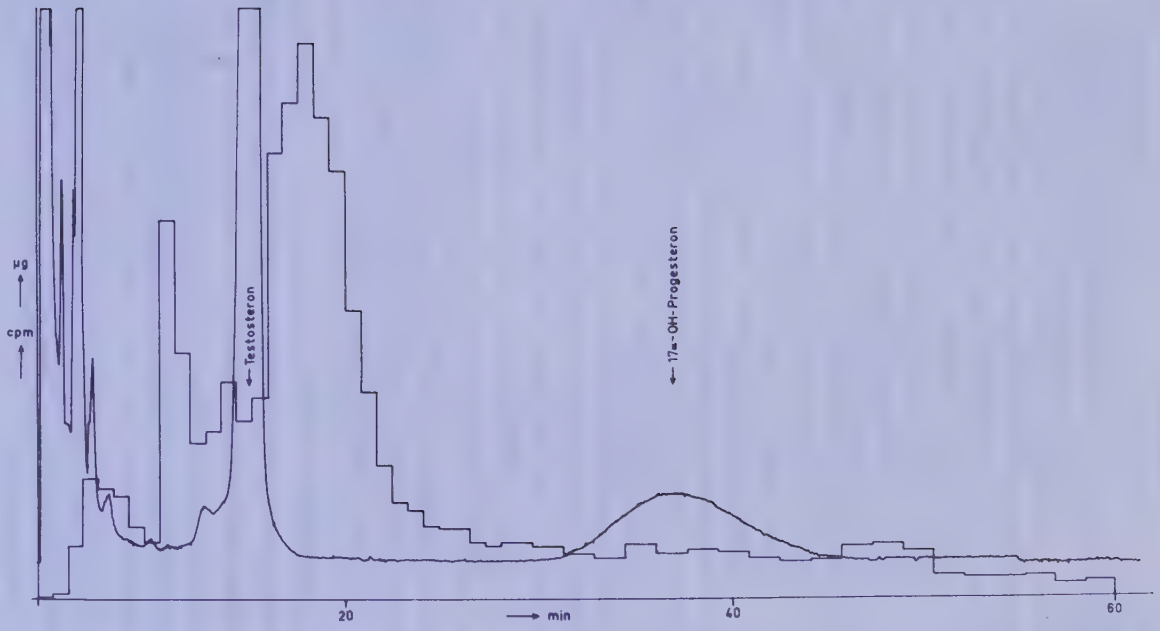


Abb. 14: Radiogaschromatogramm mit dem Eluat von Peak B_2 aus dem Papierchromatogramm in Abbildung 9, Versuch C, unter Zufügung von nicht radioaktivem Testosteron und 17α-Hydroxyprogesteron.

Abszisse: Retentionszeit in min; Ordinate: Radioaktivität in cpm bzw. Substanzmenge (vgl. hierzu S. 35 im Methodischen Teil!)

"Peak"	R_f	Substanz	IM
1	o,27	-	-
2	o,34	P^4-17α-ol-3,20-dion	IVT B, IVT C
		A^4-17β-ol-3-on	n.i.
3	o,53	P^4-20α-ol-3-on	R_2, n.g.
		5α-A -17β-ol-3-on	R_1, n.g.
		5β-A -17β-ol-3-on	R_1, n.g.
		5α-P -17α-ol-3,20-dion	R_1, n.g.
		5β-P -17α-ol-3,20-dion	R_1, n.g.
4	o,68	P^4-20β-ol-3-on	R_2, n.g.
5	o,73	5α-P -20α-ol-3-on	R_2, n.g.
		5α-P -3α-ol-20-on	R_2, n.g.
		5α-P -3β-ol-20-on	R_2, n.g.
6	o,79	P^4-3,20-dion	IVT A, IVT D, IVT H
		5α-P -20β-ol-3-on	R_1, n.g.
7	o,85	5α-P -3,20-dion	IVT F, IVT G
		5β-P -3,20-dion	IVT E, IVT I, IVT K
		5α(β)-A -3,17-dion	n.i.
		5α-A^{16}-3-on	n.i.

Tab. 10: Liste der nachgewiesenen und vermuteten Metabolite des Progesterons in Prostata und Vesikulardrüse aus den Versuchen B, C (ORE) und D (HEORE) (vgl. Abb. 8 - 12)

IM = Identifizierungsmethode

R_n = Vergleich des R_f-Wertes mit dem der Referenzsubstanz in n Chromatographiesystemen

IVT n = Rekristallisation bis zur konstanten spezifischen Aktivität (Isotopen-Verdünnungs-Technik), n = Nummer der IVT in Abb. 13

n.g. = wegen zu kleiner Radioaktivitätsmenge oder fehlender Referenzsubstanz nicht geprüft

n.i. = nicht identifiziert

C) Diskussion

1) Aufnahmestudie

a) Deutung der Unterschiede zwischen STH- und Prolaktinwirkung

Wie aus Abbildung 7 und Tabelle 6 hervorgeht, ist die Wirkung des Wachstumshormons deutlich stärker als die des Prolaktins. Auf das Molekulargewicht bezogen wirkt nach diesen Ergebnissen das STH ca 1o mal stärker auf die Prostata und ca 9 mal stärker auf die Vesikulardrüsen als Prolaktin. Ein starker Einfluß des Wachstumshormons auf alle Organe des Körpers ist bei juvenilen Tieren allerdings auch nicht verwunderlich. Möglicherweise gewinnt bei der erwachsenen Ratte das Prolaktin eine größere Bedeutung.

Die starke Aufnahmesteigerung nach Vorbehandlung mit dem Präparat der Schering AG ist leicht zu erklären, wenn man voraussetzt, daß zwischen der in der Vorbehandlung eingesetzten Hormonmenge und der erzielten Wirkung eine proportionale Beziehung herrscht. Da 94 nMol STH in der Prostata eine Aufnahmesteigerung von 46,2%, und 266 nMol Prolaktin eine Aufnahmesteigerung von 13% bewirken, müßten 164 nMol STH und 183 nMol Prolaktin eine Aufnahmesteigerung von zusammen 9o% ergeben (Zahlen siehe Abb. 4!). Die Differenz zwischen den errechneten 9o% und den experimentell gefundenen 74,1% mag sich daraus erklären, daß der STH-Gehalt des Schering-Präparates nicht bestimmt, sondern unter der Annahme der Sauberkeit des Präparates errechnet wurde (s.o.). Unabhängig davon muß darauf hingewiesen werden, daß die oben erwähnte Annahme der Linearität sicherlich stark vereinfacht. Eine lineare Beziehung gilt möglicherweise nur für physiologische, kontinuierlich fließende Hormonmengen und deren Wirkungen, jedoch wahrscheinlich nicht für hoch-überphysiologische, stoßweise zugeführte Dosen. Da aber unter den Versuchsbedingungen Hormone diskontinuierlich und in zeitweise überphysiologischen Mengen (s.u.) gegeben wurden, kann eine Berechnung, die auf einer unter anderen Bedingungen möglicherweise geltenden Linearität fusst, nur ungenaue Ergebnisse liefern.

b) Deutung der Unterschiede zwischen Prostata und Vesikulardrüse

Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Organen ergibt sich nur für die Gruppe V, d.h. bei Einwirken der endogenen Hypophysenhormone. Unter dem Einfluß exogener, artfremder Hypophysenhormone dagegen sprechen Prostata und Vesikulardrüse praktisch gleich stark an.

Da eine Überdosierung in der Vorbehandlung Unterschiede zwischen den beiden Organen nivellieren könnte, stellt sich die Frage, ob die zugeführten Hormonmengen im physiologischen Bereich lagen, oder weit darüber. Die diesbezüglichen Zahlen für die Ratte sind nicht bekannt, wohl aber für den Menschen. Das Human Growth Hormone (HGH) mit einem Molekulargewicht von 21500 hat im Blutplasma eine Konzentration von 0 - 0,14 pMol/ml (0 - 3 ng/ml), seine Halbwertszeit beträgt 25 min und die Tagessekretion liegt bei 0,14 - 0,23 µMol (3 - 5 mg) (47). Unter dem Vorbehalt, daß eine Gleichsetzung der Verhältnisse beim Menschen und bei der Ratte sicher nicht richtig ist, sei dennoch eine Kalkulation mit diesen Zahlen erlaubt. Es ergibt sich, daß die Tagesdosis von 31,3 nMol (siehe Abb. 4) bereits nach 5 h in physiologische Bereiche absinkt, nach 24 h (also vor der nächsten Injektion) im ppMol/ml-Bereich liegt.

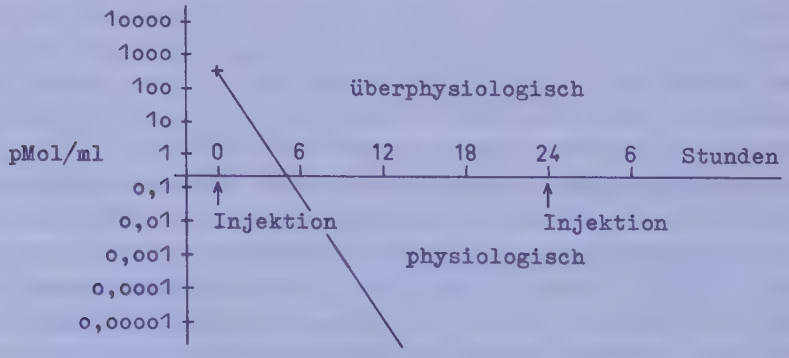


Abb. 15: Absinken der Plasmakonzentration von Human Growth Hormone (bei fehlender Hypophyse und Injektion von 31,3 nMol HGH pro Tag); errechnet.

Im übrigen dürften auch bei der Gruppe V eher pathophysiologische Hormonmengen gewirkt haben, weil der negative Rückkopplungsmechanismus zwischen Erfolgsorgan und Hypophyse durch die Kastration unterbrochen, und dadurch die Hypophyse zu vermehrter Sekretion von Gonadotropinen veranlaßt wurde.

Es ist durchaus denkbar, daß die Gonadotropine, ACTH oder TSH einen Einfluß haben, der speziell die Prostata betrifft, und der natürlich bei den HEOREn, nur STH- und Prolaktin-substituierten Tieren der Gruppen II-IV nicht zum Tragen kommen kann. Eine Untersuchung über den Einfluß der in dieser Arbeit nicht berücksichtigten Hypophysenhormone steht noch aus.

Ein unterschiedlicher Entwicklungsstand könnte die Diskrepanz zwischen Prostata und Vesikulardrüse bei Gruppe V erklären. Hierüber fehlen Angaben für die Prostata. Über die Vesikulardrüse ist bekannt, daß ihre Fähigkeit, Sekret zu bilden, mit dem 16. Lebenstag beginnt und bis zum 5o. Tag zunimmt (56). Zwischen dem 5o. und 6o. Lebenstag werden die Tiere geschlechtsreif. Daraus läßt sich nur folgern, daß beide Organe zum Versuchszeitpunkt noch nicht voll ausgereift sind. Gegen eine Bedeutung des Entwicklungsstandes sprechen Untersuchungen im eigenen Arbeitskreis (57), bei denen sich zeigte, daß Hypophys-Orchidektomie und Vorbehandlung mit STH, Prolaktin und Testosteron oder Progesteron auf die Gewichte und die Nukleinsäurekonzentrationen der Prostata stärker wirken als auf die der Vesikulardrüse. Diese Beobachtung ist nämlich weitgehend unabhängig von der Tatsache, daß Wachstum und Funktionssteigerung beider Organe bis zur Geschlechtsreife anhalten.

Wenn sich bei den vorliegenden Untersuchungen unter STH- und Prolaktinvorbehandlung die Aufnahmeraten von Progesteron in Prostata und Vesikulardrüse nicht wesentlich unterscheiden, dann kommt als Schluß nur infrage, daß das einmal in die Vesikulardrüse aufgenommene Progesteron hier weniger auszurichten vermag als in der Prostata. Da entsprechende Ergebnisse auch für Testosteron gefunden wurden (58), ist hierbei nicht einmal anzunehmen, daß die stärkere Wirkung von Progesteron in der Prostata

gegenüber der Vesikulardrüse darauf zurückzuführen ist, daß Progesteron stärker in Androgene umgewandelt wird.

Sollten STH und Prolaktin die Synthese an sich gleicher Rezeptoren in Prostata und Vesikulardrüse unterschiedlich fördern, so würde dem die Tatsache widersprechen, daß die Aufnahme der interessierenden Steroide durch STH und Prolaktin in beide Organe etwa gleich gesteigert wird. Andererseits erklärt die Vorstellung, daß STH lediglich die Permeabilität der Membran für Progesteron bzw. Testosteron erhöht, nicht die Tatsache, daß zwar in beiden Organen die Aufnahme gesteigert wird, Nukleinsäurestoffwechsel und Wachstum dagegen unterschiedlich beeinflußt werden.

Es bleiben als Erklärung der Diskrepanz nur folgende Möglichkeiten:

1) Die Rezeptoren für 5α-Dihydroprogesteron (oder Progesteron selbst, s.u.) sind in der Prostata andere (etwa mit größerer Affinität) als in der Vesikulardrüse.
2) Die Rezeptoren sind zwar die gleichen, aber in der Vesikulardrüse bestehen für die Rezeptor-Steroid-Komplexe größere Schwierigkeiten, an den genetischen Apparat im Kern heranzukommen.

2) Metabolitstudien

Das hervorstechendste Ergebnis der Metabolituntersuchungen ist die weitgehende Ähnlichkeit der Metabolitspektren des Progesterons sowohl nach sehr verschiedenen Vorbehandlungen als auch in den beiden akzessorischen Organen. Vor allem wurden keine auffallenden Mengen von Androgenen gefunden, so daß nicht wahrscheinlich ist, daß der starke Einfluß einer STH/Prolaktin/Progesteron-Vorbehandlung auf das Wachstum und den Nukleinsäurestoffwechsel der Prostata über eine verstärkte Bildung von Androgenen zustande kommt. Selbstverständlich kann nicht ausgeschlossen werden, daß kleine Mengen von Androgenen synthetisiert worden sind. Der Versuch ihres Nachweises scheiterte an den geringen Radioaktivitätsmengen in den Fraktionen, in denen Androgene prinzipiell zu erwarten waren. Bei der gaschromatographi-

schen Überprüfung der Fraktion mit dem R_f-Wert des Testosterons konnte dieses Androgen nicht aufgefunden werden, dagegen eine Reihe anderer Metabolite, die nicht identifiziert wurden. Es muß allerdings dabei betont werden, daß bei dieser gaschromatographischen Überprüfung zunächst Blut eingesetzt wurde, um genügend Radioaktivität zur Verfügung zu haben (vergleiche die Abbildungen 9 bis 12). Sollten dennoch kleinste Androgenmengen entstanden sein, bliebe die Frage offen, warum eine solch unauffällige Menge zu so deutlichen androgenen Wirkungen führt.

Am Rande sei erwähnt, daß kleine Mengen von 17α-Hydroxyprogesteron nachgewiesen werden konnten. 17α-Hydroxyprogesteron ist als Vorstufe des Androstendions, das bereits androgene Wirkungen hat, nicht uninteressant. Allerdings wurde kein Androstendion gefunden.

Während zwischen Vorbehandelten und Kontrollen bei ein und demselben Organ praktisch keine Unterschiede beobachtet wurden, lassen sich beim Vergleich von Prostata und Vesikulardrüse insbesondere nach der STH/Prolaktin/Progesteron-Vorbehandlung doch einige Differenzen feststellen. Zuallererst fiel auf, daß der Anteil des unveränderten Progesterons am Gesamtmetabolitspektrum bei Prostata zwischen 35 und 45%, bei Vesikulardrüse jedoch zwischen 6o und 7o% lag, was gewisse Rückschlüsse auf die Stoffwechselaktivität beider Organe zuläßt. Ferner ist bei der Prostata die Radioaktivitätszone, in der theoretisch 5α-Dihydrotestosteron, Androsteron vorkommen könnten, im Verhältnis zu der Radioaktivitätszone mit dem R_f-Wert des Testosterons und des 17α-Hydroxyprogesterons etwas stärker vertreten als bei der Vesikulardrüse. Ob in dieser Radioaktivitätszone ein Metabolit zu suchen ist, der für die stärkere Ansprechbarkeit der Prostata verantwortlich ist, kann zur Zeit nicht beurteilt werden. Die Dünnschicht- und Papierchromatographischen Untersuchungen mit Referenzsubstanzen haben keine Anhaltspunkte dafür gebracht, daß deutliche Mengen 5α-Dihydrotestosteron im interessierenden Bereich vorhanden sind. Eine weitere Beobachtung - wieder mit kleinen Unterschieden zwischen Prostata und Vesikulardrüse -

ist das Auftreten von 5α-Dihydroprogesteron. Wie aus Abbildung 2 hervorgeht, ist 5α-Dihydroprogesteron sowohl für die Entstehung von Androgenen, als auch für den Endabbau des Progesterons eine wichtige Zwischenstufe. 5α-P-17α-ol-3,2o-dion und 5α-A-3,17-dion konnten jedoch nicht aufgefunden werden.

Wie soll man sich nun das Zustandekommen der Wirkungen der STH/Prolaktin/Progesteron-Vorbehandlung vorstellen, wenn keine verstärkte Androgensynthese vorliegt? Als Möglichkeiten bleiben:

1) Die Vorbehandlung erhöht die Synthese von Rezeptoren, mit der kleinste Androgenmengen, die aus Progesteron entstanden sind, besser abgefangen und in den Kern transportiert werden können. Eine Variante dieser Vorstellung besteht in der Annahme, daß Progesteron selbst gebunden werden kann und im Kern als Rezeptor-Steroid-Komplex androgene Wirkungen ausübt.
2) Die Vorbehandlung könnte die Permeabilität der Membranen erhöhen, zum Beispiel für kleine Androgenmengen.
3) Es ist nicht auszuschließen, daß die vollen androgenen Wirkungen in den akzessorischen Sexualorganen erst dann zustande kommen, wenn zu den Wirkungen des primären Messengers "Androgen" die Wirkungen des sekundären Messengers "Zyklisches AMP" hinzukommen. Die Synthese dieses zyklischen AMP wird aber von STH und Prolaktin erhöht. Wenn diese Vorstellung richtig ist, bedarf es also unter physiologischen Bedingungen eines Zusammenwirkens von STH/Prolaktin (zyklisches AMP ↑) einerseits und von (aus Progesteron entstanden?) Androgenen oder Progesteron selbst als Rezeptor-Steroid-Komplex andererseits.

IV Zusammenfassung

Unter Einsatz juveniler intakter, juveniler orchidektomierter (ORE) sowie jeveniler hypophysektomierter-orchidektomierter (HEORE) Ratten wurde der Einfluß von STH (Rind) und Prolaktin (Rind) auf die Aufnahme und Metabolisierung von Progesteron in Prostata und Vesikulardrüse studiert.

Bei den Aufnahmestudien wurden jeweils Gruppen von 10 Tieren am 3o. Tag orchidektomiert bzw. hypophysektomiert-orchidektomiert und am 31., 32. und 33. Lebenstag entweder mit den Lösungsmitteln oder mit täglichen Dosen von 1,5 mg STH bzw. 2 mg Prolaktin bzw. 4 mg eines Schering-Mischpräparates (STH + Prolaktin) vorbehandelt. Am 33. Lebenstag erfolgte 15 min vor Sektion subkutane Injektion von je 10 µCi (o,327 µg) Progesteron-7α-^{3}H. Die Radioanalyse erfolgte mit Hilfe der Flüssig-Szintillations-Spektrometrie.

Die Vorbehandlung der HEORE-Tiere mit den beiden Hypophysenhormonen führte zum Teil zu deutlichen Steigerungen der Aufnahme des Progesterons in die akzessorischen Sexualorgane. Hierbei war die Wirkung des STH bezüglich der Förderung der Aufnahme des Progesterons etwa dreimal stärker als die des Prolaktins. Dies galt sowohl für die Prostata als auch für die Vesikulardrüse. Allerdings waren die Wirkungen bei der Prostata deutlich stärker als bei der Vesikulardrüse (46% bei Prostata und 36% bei Vesikulardrüse). Trotzdem waren beide Effekte signifikant ($p < o,oo25$ bzw. $p < o,o1$).

Ein Vergleich der HEORE- mit den ORE-Lösungsmittelkontrollen erlaubte die Beurteilung, in welchem Ausmaß die Hormone der intakten Hypophysen die Aufnahme des Progesterons fördern. Bei Prostata konnte eine signifikante (27%, $p < o,o5$), bei Vesikulardrüse nur eine nicht-signifikante (6%) Aufnahmesteigerung beobachtet werden.

Die aufgefundene Förderung der Aufnahme von Progesteron in die beiden akzessorischen Sexualorgane durch STH und Prolaktin wird zur Erklärung des synergistischen Effekts der beiden Hypophysenhormone bezüglich der androgenen Wirkungen des Progesterons auf

die akzessorischen Sexualorgane herangezogen.

Bei den Metabolitstudien wurden ORE- und HEORE-Ratten eingesetzt, die vom 23. - 27. Lebenstag täglich mit 5 mg Progesteron vorbehandelt wurden. Die HEORE-Gruppen erhielten außerdem tägliche Dosen von 4 mg des Mischpräparates (STH + Prolaktin). Auch hierbei wurden jedem Tier 15 min vor Sektion radioaktiv-markiertes Progesteron appliziert, jedoch in Form einer Mischung von Progesteron-4-^{14}C und Progesteron-7α-^{3}H. Nach Extraktion der freien Steroide erfolgten kombinierte papier- und dünnschichtchromatographische Auftrennungen unter Einsatz von Referenzsubstanzen. Die Radioanalyse wurde mit Hilfe eines Radiopapier- und Dünnschichtchromatographen ("Scanner") und zum Teil wiederum mit der Flüssig-Szintillations-Spektrometrie durchgeführt. Bei Vorliegen genügender Radioaktivitätsmengen wurde die Identifizierung mit Hilfe der inversen Isotopenverdünnungstechnik vervollständigt.

15 min nach Applikation herrschte bei allen Gruppen - abgesehen von den hochpolaren Metaboliten - unverändertes Progesteron bei weitem vor. Damit beziehen sich die oben erwähnten Ergebnisse bezüglich einer Förderung der Aufnahme von Progesteron durch die beiden Hypophysenhormone tatsächlich in erster Linie auf Progesteron selbst.

Die Metabolitspektren aller Gruppen waren außerordentlich ähnlich. Hypophysektomie sowie Behandlung mit STH und Prolaktin führten somit zu keiner signifikanten Beeinflussung der Metabolisierung bei Vergleich mit den ORE-Ratten. Der einzige Metabolit, der in nennenswerter Menge auftrat und daher einer Isotopenverdünnungsanalyse unterzogen werden konnte, war 5α-Dihydroprogesteron.

Androgene wurden nicht aufgefunden. Mit Hilfe der Isotopenverdünnungstechnik wurden lediglich kleine Mengen des Zwischenproduktes 17α-Hydroxyprogesteron aufgefunden, wegen der geringen Radioaktivitätsmenge jedoch mit einer gewissen Unsicherheit. Auf weitere Metabolite soll in dieser Zusammenfassung nicht eingegangen werden, weil im Rahmen dieser Arbeit lediglich die Fra-

ge interessierte, ob unter den gewählten Bedingungen in den akzessorischen Sexualorganen Androgene auftreten, verstärkt unter dem Einfluß der Hypophysenhormone. Es muß vorläufig offen bleiben, ob die androgenen Wirkungen des Progesterons von Progesteron selbst verursacht werden oder doch auf kleinste Mengen an Androgenen zurückzuführen sind, die bisher nicht erfaßt werden konnten.

Literaturverzeichnis

1. LABHART,A.: Klinik der inneren Sekretion, 2.Auflage, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1971, Seite 77 ff (STH), 695 ff (Prolaktin), 458 ff (Testosteron), 533 ff (Progesteron)

2. YANG,W.H., SAIRAM,M.R., CHOH HAOMLI: Acta endocrin. 72,173,(1973)

3. AMMON,R., DIRSCHERL,W.: Fermente, Hormone, Vitamine, 3.Auflage, Band II, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1959

4. MANN,T.: The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract, London: Methuen & Co Ltd (1964), Seite 3o8-338

5. GOODMAN,L.S., GILMAN,A.: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 4th Edeition, The MacMillan Company 197o, Seite 1566-158o

6. KOCHAKIAN,C.D., J.R.MURLIN: J. of Nutrition 1o, 437 (1935)

7. KOCHAKIAN,C.D., B.G.HARRISON: Endocrinology 7o, 99 (1962)

KOCHAKIAN,C.D., J.HILL: Biochem. 5, 1696 (1966)

8. KOCHAKIAN,C.D., P.KARLSON: Mechanisms of Hormone Action, Georg Thieme Verlag, Stuttgart und Academic Press, New York und London 1965, Seite 192

9. WICKS,W.D., D.L.GREENMAN, F.T.KENNEY: J. Biol.Chem. 24o, 4414 (1965)

1o. TATA,J.R.: Nature (London) 219, 331 (1968)

11. BEAULIEU,E.E.in: Endocrinology,(Proceedings of the Fourth International Congress of Endocrinology, Washington,D.C., June 18-24,1972) Editor R.O. SCOW, Excerpta Medica Amsterdam, American Elsevier Publishing Co., Inc., N.Y. 1973, Seite 3o-62

12. MAINWARING,W., F.MANGAN, B.PETERKEN: Biochem. J. 123, 619 (1971)

13. COHCH,R.M., K.M.ANDERSON: Biochemistry 12, 3114 (1973)

14. MAINWARING, W.I.P., P.A.WILCE: Biochem. J. 134, 795 (1973)

15. HAMILTON,T.H.: Effects of Sexual Steroid Hormones on Genetic Transcription and Translation. Basic Action of Sex Steroids on Target Organs (Editors: P.O.HUBINONT et al.), S.Karger, Basel, München, Paris

16. LIBBY,P.R.: Biochem. J. 134, 9o7 (1973)

17. DAHNKE,H.-G., A.SCHEUER, K.-O.MOSEBACH: J. Endocrin. 59, 535 (1973)

18. NEUMANN,F., H.STEINBECK, R.v.BERSWORDT-WALLRABE: Endocrinology 52, 54 (1967)

19. v.BERSWORDT-WALLRABE,R., U.BIELITZ, W.ELGER, H.STEINBECK: The J. of Urology 1o3, 18o-186 (197o)

2o. GRAYHACK,J.T.: Nat.Cancer Inst.Monogr. 12, 189 (1963)

21. v.BERSWORDT-WALLRABE,R., H.STEINBECK, J.HAHN, W.ELGER: Experientia 25, 533 (1969)

22. PEYRE,A.: C.R.Soc.Biol. 162, 15992 (1968)

23. APOSTOLAKIS,M.: Vitamins and Hormones 26, 197 (1968)

24. OFNER,P.: Vitamins and Hormones 26, 237 (1968)

25. REES,G.P.van, O.L.WOLHUIS, S.E.DE JONGH: Acta endocrin. 69, 153 (1972)

26. LOSTROH,A.J.: Endocrinology 7o, 747 (1962)

27. ELBING,F.J., E.ELBING, J.SKINNER: The Influence of Pituitary Hormones on the Response of the Sebaceous Gland of the Rat to Testosterone, J. of Endocrin. 45, 245-256 (1969)

28. SCHEUER,A., H.-G.DAHNKE, E.JÄGER, K.-O.MOSEBACH: Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chemie, 350, 1570 (1969)

29. SCHEUER,A., H.-G.DAHNKE, K.-O.MOSEBACH: Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chemie, 352, 707-712 (1971)

30. DAHNKE,H.-G., A.SCHEUER, K.-O.MOSEBACH: Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chemie, 354, 1141-1145 (1973)

31. v.BERSWORDT-WALLRABE,R., A.SCHEUER, H.-G.DAHNKE, K.-O.MOSEBACH: Acta endocrinol., Suppl. 152, 7 (1971)

32. NOUMARA,T., J.WEISZ, C.W.LLOYD: Endocrinol. 78, 245 (1966)

33. BLOCH,E.: Steroids 9, 415 (1967)

34. STEINEBERGER,E., M.FICHER: Steroids 22, 425-444 (1973)

35. YAMADA,M., K.MATSUMOTO: Endocrinol. 94, 777 (1974)

36. EINARSSON,K., J.Å.GUSTAFSSON, K.HELLSTRÖM: Biochem. J. 136, 623-628 (1973)

37. CHATTERTON jr.,R.T., T.R.FORBES: Endocrinol. 92, 1451-1457 (1973)

38. CLARK, B.F.: J.Endocrinol. 58, 555-562 (1973)

39. BEAULIEU,E.E. et al.: Rec.Prog.in.Horm.Res. 27, 351 (1971)

40. JENSEN,E.V., E.R.DE SOMBRE: Ann.Rev.Biochem. 41, 203 (1972)

41. v.LICHTENBERG,A., F.VOELCKER, H.WILDBOLZ: Handbuch der Urologie, V.Band, Spez.Urologie III, J.Springer, Berlin (1928)

42. CHWALLA,R.: Urologische Endokrinologie, Springer, Wien (1951)

43. KAUFMANN,E.,(Begründer) M.STAEMMLER (Hrsg.): Lehrbuch der speziellen pathologischen Anatomie, 11.u.12.Auflage, II.Band, 1.Teil, W.de Gruyter & Co, Berlin (1957)

44. SZENDRÖI,Z., F.BALOGH: Der Prostatakrebs, Akadémiai Kiadó, Budapest (1965)

45. TAUSK,M.: Arch. chir. neerl. 2, 36-43 (195o)

46. BERENBLUM,J.: Acta Un. Int. Cancr. 15/1, 22-3o (1958)

47. LABHART,A.: Klinik der inneren Sekretion, 2.Auflage, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1971)

48. MARX,W., M.E.SIMPSON, H.M.EVANS: Endocrin. 3o, 1 (1942)

49. PARLOW,A.F., A.E.WILHELM, L.E.REICHERT jr.: Endocr. 77, 1126 (1965)

5o. LAMBERG,B.A.: Acta Med. Scand., Suppl. 279, (1953)

51. PARLOW,A.F. in: Human Pituitary Gonadotropins, edited by A.ALBERT, 3oo (1961)

52. KARG,H.: Klinische Wochenschrift 35, 643 (1957)

53. STEELMAN,S.L., F.M.POHLEY: Endocrinol. 53, 6o4 (1953)

54. RIDDLE,O., R.W.BATES, W.DYKSHORN: Amer. J. Physiol. 1o5, 191 (1933)

55. LI,C.H., J.S.Dixon, T.-B.LO, K.D.Schmidt, Y.A.PANKOV: Archivs of Biochem. and Biophys. 141, 7o5 (1971)

56. DAHNKE, H.-G.: Inauguraldissertation, Bonn 1969

57. BERSWORDT-WALLRABE, R.v., A.SCHEUER, H.-G.DAHNKE, K.-O.MOSEBACH: Acta endocrinol. (Kbh) Suppl. 152, 7 (1971)

58. EDELMANN,A., C.BURGMANN, BERSWORDT-WALLRABE,R.v., MOSEBACH,K.-O.: Acta endocrinol. (Kbh) Suppl. 184, 154 (1974)

59. GOLLMER,D.: Inauguraldissertation, Bonn, in Vorbereitung

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Karl-Oskar MOSEBACH danke ich herzlich für die Überlassung des interessanten Themas und für die eingehende praktische und wissenschaftliche Beratung.
Allen Mitarbeitern der Physikalisch-Chemischen Abteilung sei gleichfalls für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei allen auftretenden Schwierigkeiten gedankt.
Schließlich danke ich Frau R.Cramer für die gewissenhafte Ausführung der Schreibarbeiten.

Lebenslauf

Am 15.Juni 1949 wurde ich als fünftes Kind der Ärzte Wilhelm und Ruth Burgmann in Bielefeld geboren.
Von 1954 - 1958 besuchte ich die evangelische Volksschule in Bad Godesberg, anschließend das Staatliche Nicolaus-Cusanus-Gymnasium, wo ich 1967 die Reifeprüfung ablegte.
1967 nahm ich an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn das Medizinstudium auf, das ich 1973 mit dem Staatsexamen abschloß. Im darauffolgenden Jahr arbeitete ich je vier Monate als Medizinalassistent in der Physikalisch-Chemischen Abteilung des Physiologisch-Chemischen Instituts der Universität Bonn, in der Rheinklinik (Fachklinik für Innere Medizin und Neurologie) Bad Honnef und in der Chirurgischen Universitätsklinik Bonn.
Seit 1973 studiere ich Psychologie an der Ruhr-Universität Bochum.